

**Die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin
sowie β -Catenin im Oberflächenepithel:
Unterschiede im bovinen und humanen System**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.**

**an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig**

eingereicht von: Eleni Valerkou

Geburtsdatum: 23.10.1982

Geburtsort: Athen

angefertigt am: Institut für Anatomie
Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer: Frau Prof. Dr. med. Katharina Spanel-Borowski

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.03.2011

Bibliographische Beschreibung

Valerkou, Eleni

„Die Expression von E-Cadherin und N-Cadherin sowie β -Catenin im Oberflächenepithel: Unterschiede im bovinen und humanen System“

Universität Leipzig, Dissertation

70 S., 125 Lit., 14 Abb., 10 Tab.

Referat:

Das Oberflächenepithel (OSE) des Ovars besteht aus einer Schicht flacher oder kubischen Zellen, die am Hilus in das flache Peritonealepithel übergehen. Das OSE zeigt zyklusabhängige Veränderungen. OSE-Zellen sollen am Prozess der Ovulation aktiv teilnehmen und die Läsion nach der Follikelruptur reparieren. Die mitotische Aktivität der OSE-Zellen um den Reparatur-Prozess könnte das Überleben von mutierten Zellen begünstigen und zum Ovarialkarzinom führen. Hierbei spielen Zell-Zell-Kontakte eine Schlüsselrolle bei der Integrität von Gewebe und der Metastasierung von Tumoren. Um das Verständnis über die Pathogenese des Ovarialkarzinoms zu verbessern, untersuchte die vorliegende Arbeit die Zell-Zell-Kontakte des OSE sowie dessen Abhängigkeit von Interferon- γ (IFN- γ), welches u.a. bei der adjuvanten Therapie des Ovarialkarzinoms verwendet wird. Abstriche von humanen und bovinen Ovarien dienten als Quelle zur Kultivierung von OSE-Zellen. Konfluente Kulturen wurden mit 200 U/ml rekombinantem, speziesspezifischem IFN- γ für 72 h behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Die Morphologie der OSE-Zellen vor und nach der Behandlung wurde dargestellt. Weiterhin wurden mittels immunzytologischer Färbungen sowie Western Blot Analyse E- und N-Cadherin, β -Catenin, Cytokeratin sowie Vimentin nachgewiesen. Permeabilitätsmessungen von Meerrettichperoxidase (HRP) in einem Ko-Kultursystem wurden mit und ohne IFN- γ durchgeführt. Die Arbeit zeigt eine neue Wirkung von IFN- γ . Es hat die besondere Eigenschaft, das OSE komplett über Cadherin-vermittelte „tight junctions“ abzudichten. Dies könnte die Wirksamkeit des Zytokins bei der adjuvanten Therapie des Ovarialkarzinoms erklären. Möglicherweise werden Interzellularkontakte verstärkt und die Frühinvasion maligner Zellen eingeschränkt. Das erstmals beschriebene Cadherinmuster an den Zell-zu-Zell-Ecken verweist auf die Interaktion der „tight junctions“ mit E-Cadherin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen	i
Tabellen	ii
Abkürzungen	iii
1 Einleitung	1
1.1 Das Ovar in den verschiedenen Lebensphasen	1
1.2 Eigenschaften und Funktion des OSE	2
1.3 Zell-Zell-Kontakte	3
1.4 Cadherine	4
1.5 OSE, Ovarialkarzinom und IFN- γ	6
1.6 Aufgabenstellung und Ziele	7
2 Material und Methode	9
2.1 Material	9
2.1.1 Verbrauchsmaterial, Geräte	9
2.1.2 OSE-Zellen und Ovarien	11
2.2 Methode	12
2.2.1 Kultivierung	12
2.2.2 Immunhistologische Färbungen	13
2.2.3 Zellkultur für die Western Blot Analyse (Tab. 6 und 7)	17
2.2.4 Messung der Permeabilität (Tab. 9)	22
2.2.5 Bild- und Datenauswertung und statistische Bearbeitung	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Bovine und humane OSE-Zellen bilden Monolayer	24
3.2 Bovine und humane OSE-Zellen bilden Cytokeratin-Netzwerke	25
3.3 Bovine und humane OSE-Zellen entwickeln Vimentin-Filamente	26
3.4 Bovine und humane OSE-Zellen unterscheiden sich in der Expression von E-Cadherin und N-Cadherin	28
3.5 Bovine und humane OSE-Zellen zeigen Unterschiede in der β -Catenin-Färbung	30
3.6 Das intakte OSE des menschlichen Ovars bildet E- und N-Cadherin	33
3.7 Mit IFN- γ behandelte bovine OSE-Kulturen sind impermeabel für HRP	34
4 Diskussion	37
4.1 Anlegen einer Primärzellkultur	37
4.2 Vor- und Nachteile bei der Etablierung	38
4.2 Morphologische Unterschiede zwischen bovinen und humanen OSE-Zellkulturen	40

4.2.1 Kulturen ohne IFN- γ	40
4.2.2 Kulturen mit IFN- γ	40
4.2.3 Anmerkungen zur immunologischen Antigenlokalisation	42
4.3 Keine Permeabilität für HRP bei IFN- γ behandelten, bovinen OSE-Kulturen	43
4.4 Mögliche Interaktionen der „tight junctions“ und klinische Bedeutung	44
4.5 Das bovine OSE als Modell der Kanzerogenese	45
4.6 IFN- γ und seine Wirkung im Ovar	46
4.7 Ovarialkarzinom und OSE.....	47
4.8 Schlussfolgerungen.....	48
4.9 Ausblick.....	49
5. Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis.....	52
Danksagung	58
Curriculum Vitae	59
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	61

Abbildungen

Abb. 1: Morphologie boviner und humaner OSE-Zellen im Phasenkontrastmikroskop	24
Abb. 2: Cytokeratinfärbung mit Immunfluoreszenz bei bovinen und humanen OSE-Zellen..	26
Abb. 3: Vimentinfärbung mit Immunfluoreszenz bei bovinen und humanen OSE-Zellen	27
Abb. 4: Western Blot Analyse für Cytokeratin und Vimentin in unbehandelten und IFN- γ behandelten OSE-Kulturen.....	27
Abb. 5: Bovine OSE-Zellen exprimieren E-Cadherin, jedoch nicht N-Cadherin	28
Abb. 6: Humane OSE-Zellen exprimieren E-Cadherin und N-Cadherin.....	29
Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin-Expression bei bovinen und humanen OSE-Zellen	30
Abb. 8: Western Blot Analyse für bovine OSE in (A) und humane in (B). E-Cadherin, N-Cadherin und β -Catenin in unbehandelten und IFN- γ behandelten Kulturen.	31
Abb. 9: Immunhistochemie für E- und N-Cadherin des OSE boviner und humaner Ovarien.	33
Abb. 10: Permeabilität für HRP in bovinen und humanen OSE-Zellkulturen.....	34
Abb. 11: Permeabilität für HRP in bovinen OSE-Zellkulturen 12 und 60 h nach Stimulation mit IFN- γ , sowie 72 h nach Stimulation und weiteren 72 h ohne IFN- γ	35
Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung für Occludin-Expression bei bovinen OSE-Zellen	36
Abb. 13: Die Mischkultur zeigt links Granulosazellen und rechts epithelioide OSE-Zellen...	39
Abb. 14: Schematische Zeichnung der trizellulären“tight junction“.	45

Tabellen

Tab. 1: Medien und Pufferlösungen in der Zellkultur.....	13
Tab. 2: Pufferlösungen für Immunfluoreszenzfärbungen	14
Tab. 3: Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen	14
Tab. 4: Primär- und Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbungen	15
Tab. 5: Pufferlösungen für Immunhistochemie.....	16
Tab. 6: Pufferlösungen	18
Tab. 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels	20
Tab. 8: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot Analyse	21
Tab. 9: Lösungen für HRP-Versuche	22
Tab. 10: Semiquantitative Auswertung aller Ergebnisse zum OSE anhand immunzytologischer Färbungen und Western Blot Analyse	32

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxydisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAM	Cell adhesion molecule
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK ⁺	positiv für Cytokeratin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ²⁺ /Cu ⁺	zwei-/einwertiges Kupfer
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transformation
et al.	et alii, und andere
FKS	fetales Rinderkälberserum
g	Gramm
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN-γ	Interferon-γ
kDa	Kilodalton
min	Minuten
NaCl	Kochsalz
NCAM	neuron cell adhesion molecule

OSE	Ovarian surface epithelium
PBS	Phosphatgepufferte NaCl-Lösung
pH	pons hydrogenium
PSA	Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Ampicillin)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
sec	Sekunden
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units per milliliter
V	Volt
WHO	World Health Organisation

1 Einleitung

1.1 Das Ovar in den verschiedenen Lebensphasen

Durch Proliferation des Zoelomepithels und des Mesenchyms der Keimleisten werden die Ovarien bereits beim 4-5 mm großen Embryo angelegt (indifferente Phase). Die genetisch determinierte weibliche Gonadenanlage setzt die indifferente Phase bis zur 7. Entwicklungswoche fort. Dieses wird dem Fehlen von Hodensträngen zugesprochen. Das Oberflächenepithel des späteren Ovars (OSE, eng. ovarian surface epithelium), bildet die Keimepithelstränge, in denen die Keimzellen siedeln. Aus den medullären Anteilen der Stränge entstehen Primordialfollikel. Die kortikalen Anteile werden durch eine dünne Bindegewebskapsel ersetzt, die später als Tunica albuginea bezeichnet wird. Durch die Rückbildung der Urniere separiert sich das zukünftige Ovar von der dorsalen Bauchwand ab und bekommt eine eigene mesenteriale Aufhängung – das Mesovar. Dabei bleibt das OSE nach der Geburt als eine Schicht flacher oder kubischer Zellen bestehen, die am Hilus in das flache Epithel des Mesovars übergehen.

Das OSE wurde bis Mitte des 20. Jahrhunderts „Keimepithel“ genannt, weil man annahm, dass sich aus ihm bei einer erwachsenen Frau Keimzellen bilden können. Die Größe des geschlechtsreifen Ovars (durchschnittlich 3,5 x 2,5 x 1,5 cm) und die hormonelle Aktivität hängen vom Follikelzustand ab. Während der Kindheit bis zur Menarche (1. Regelblutung) sind die Östrogenwerte wegen kleiner Tertiärfollikel niedrig. Im Alter von 12-14 Jahren steigen die Hormonwerte steil an und zeigen hohe Werte bis zum Klimakterium (zyklische präovulatorische Follikel) und der Menopause. In der Post-Menopause mit Sistieren des ovariellen Zyklus (keine Follikel) finden sich wieder niedrige Östrogenwerte (Bässler and Remmele, 1997).

Ein bemerkenswerter Vorgang ist das sukzessive Absterben von Follikeln (Atresie) und damit von Eizellen. Der Prozess beginnt vor der Geburt und führt im Laufe des Alterns zum Verschwinden aller Follikel. In der Post-Menopause sind in der Rinde histologisch keine Follikel erkennbar. Obwohl die Ovaroberfläche im frühen Fortpflanzungsalter glatt ist, wird sie mit dem Alter infolge narbiger Einziehungen durch viele Ovulationen unregelmäßig. Das Ovar schrumpft durch Rarefizierung seiner Strukturen auf eine Größe von durchschnittlich 2,1 x 1,2 x 0,75 cm (Breckwoldt, 1994). Bei der reifen Frau hat das OSE sowie das Peritonealepithel eine Sekretions- und eine Transport-Funktion. Das OSE und das Peritonealepithel sind kontinuierlich (fließender Übergang) und beide embryologisch aus dem Zoelomepithel entstehend. Es wird behauptet, dass beide Epithelien bei der Frau sich morphologisch und funktionell unterscheiden, und unterschiedliche Malignitäten verursachen

(Auersperg et al., 2001). Diese Unterschiede müssen während der Embryonalentwicklung als Folge von streng regulierten induktiven Ereignissen entstehen. Die genaue Natur dieser Entwicklungsschritte ist weitgehend unbekannt. Es ist wahrscheinlich, dass die Differenzierung des fetalen OSE von lokalen Faktoren beeinflusst wird, die im sich entwickelnden Ovar entstehen.

1.2 Eigenschaften und Funktion des OSE

Das OSE zeigt zyklusabhängige Veränderungen, denn OSE-Zellen nehmen aktiv am Prozess der Ovulation teil. Es wird gesagt, dass OSE-Zellen aktiviert werden, wenn sie mit präovulatorischen Follikeln in Kontakt kommen. OSE-Zellen sollen proteolytische Enzyme abgeben, die die Tunica albuginea und die Follikelwand degradieren und somit das Gewebe an der späteren Rupturstelle schwächen (Bjersing and Cajander, 1974). Am Rupturort durchlaufen die OSE-Zellen den programmierten Zelltod, was zum Defekt im OSE führt (Ackerman and Murdoch, 1993). Die entstandene Läsion auf der Ovaroberfläche wird durch proliferierende OSE-Zellen der Nachbarschaft zügig repariert (Osterholzer et al., 1985). Flache OSE-Zellen zeigen an, dass die postovulatorische Proliferation durchlaufen wurde, um die Läsion auf der Ovaroberfläche zu reparieren (Gillett et al., 1991). Das der Ruptur angrenzende OSE produziert möglicherweise inflammatorische Zytokine, welche den Prozess des programmierten Zelltods verstärken (Murdoch and Martinchick, 2004). Die mitotische Aktivität der OSE-Zellen um den Reparatur-Prozess könnte das Überleben von mutierten Zellen begünstigen und zum Ovarialkarzinom führen (Wong and Leung, 2007).

Das OSE beteiligt sich an der Entstehung und Anordnung diverser Komponenten der extrazellulären Matrix (Auersperg et al., 1991). Es wird angenommen, dass dieses Epithel auch Einfluss auf das „Remodelling“ (Umbau) des ovariellen Stromas hat. OSE-Zellen sind nach der Ovulation fähig, die extrazelluläre Matrix der Tunica albuginea zu reorganisieren (Kruk and Auersperg, 1992, Kruk et al., 1994).

Während der Embryogenese durchlaufen Zellen eine epithelial-mesenchymale Transformation (EMT), welche zur Expression von N-Cadherin und einer „downregulation“ (Reduktion) von E-Cadherin im Mesoderm führt (Derycke and Bracke, 2004). Der Prozess der EMT tritt nicht nur während der Embryonalentwicklung ein, sondern auch nach der Ovulation.

Das OSE der Frau behält das Potential, sich unterschiedlich zu differenzieren. Während der postovulatorischen Reparatur sind OSE-Zellen befähigt, wie Fibroblasten zu funktionieren. Dieses bringt wahrscheinlich Vorteile bei der Reparatur der Ovaroberfläche.

Das OSE unterscheidet sich von anderen Epithelien anhand seiner schwachen Anhaftung auf der Basalmembran, von welcher sich das OSE durch mechanischen Druck leicht ablösen lässt (Auersperg and Maines-Bandiera, 2000). Bisher waren operative Eingriffe verantwortlich für den Verlust des OSE von den Ovarien älterer Frauen. Ob der OSE-Verlust physiologische/pathologische Konsequenzen hat, ist nicht bekannt (Auersperg et al., 2001). Studien über das OSE sind durch den Mangel an effizienten Modellen eingeschränkt. Normale OSE-Zellen werden aus Ratte, Kaninchen und Mensch isoliert und kultiviert (Adams and Auersperg, 1981, Piquette and Timms, 1990, Siemens and Auersperg, 1988); aber die Zellzahl und die Verfügbarkeit des Gewebes beschränkt oftmals den Einsatz dieser Modelle. Bovine Ovarien stellen ein dienliches Modell für normale OSE Biologie dar. Das bovine Ovar hat im Wesentlichen dieselbe Größe und Physiologie wie das humane Ovar (Parrott et al., 2000). Das Rind ist ein Mono-Ovulator mit einem vergleichbaren Ovarialzyklus wie bei der Frau. Somit wird das bovine Ovar als ein brauchbares Modell betrachtet, um die Biologie und Funktion des OSE zu untersuchen. Die große Anzahl von Ovarien vom Schlachthof wird für zelluläre und molekulare Untersuchungen nützlich sein und das Verständnis für das normale OSE vertiefen. Die bovine Daten können im zweiten Schritt mit dem humanen OSE verglichen werden.

1.3 Zell-Zell-Kontakte

Die Fähigkeit von Zellen, untereinander spezifische und feste Kontakte auszubilden, scheint eine wichtige Schlüsselfunktion für die Evolution komplexer Organismen zu sein. Das koordinierte Zusammenspiel vieler Zellarten innerhalb eines Gewebes sowie unterschiedlicher Gewebe ermöglicht dem Organismus den Erhalt lebenswichtiger Funktionen, wie Bewegung, Stoffwechsel und Reproduktion. Schon während der embryonalen Entwicklung lösen adhäsive Interaktionen eine Vielzahl von morphogenetischen Prozessen aus. Manche haben unmittelbare Konsequenzen, während andere eher langfristige Wirkungen haben.

Die Zell-Zell-Adhäsion ist ein komplexes System, in welches verschiedene Faktoren und Mechanismen involviert sind. Man unterscheidet einen Ca^{2+} -abhängigen und einen Ca^{2+} -unabhängigen Mechanismus mit unterschiedliche Klassen von Zelladhäsionsmolekülen (CAM = engl. Cell adhesion molecule) (Stamatoglou and Hughes, 1994). Adhäsionsmoleküle werden den vier Hauptfamilien der Selektine, Integrine, Immunglobulin-Superfamilie und Cadherine zugeteilt (Gumbiner, 1996, Efsthathiou and Pignatelli, 1998).

Selektine sind kohlenhydratbindende Adhäsionsmoleküle, welche im Prozess der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielen. Bei einer akuten oder chronischen Entzündung

fördern Selektine die Adhäsion von Leukozyten am vaskulären Endothel und deren chemotaktische Emigration in das entzündete Gewebe (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999).

Integrine kontrollieren die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix. Sie geben Signale der Matrix an das Zytoskelett der Zelle weiter und werden für die Adhäsion von Zellen an Basalmembranen gebraucht. Einige Mitglieder dieser Familie können als intrazelluläre Adhäsionsmoleküle agieren, wenn deren Ligand auf der Oberfläche anderer Zellen vorhanden ist (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999). Die Immunglobulin-Superfamilie umfasst lösliche Proteine sowie Zelloberflächenproteine, die bei der Erkennung, Bindung und Adhäsion von Zellen gebraucht werden. Sie vermitteln Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zell-Adhäsion in homophiler oder heterophiler Art (Williams and Barclay, 1988). Eines dieser Immunglobuline, welches zuerst charakterisiert wurde und somit auch bekanntestes Mitglied dieser Familie ist, ist das NCAM (neuron cell adhesion molecule) (Thiery et al., 1985). Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige Adhäsionsmoleküle, die selektive Zell-Zell Kontakte vermitteln und die Genexpression durch Verbindung mit Cateninen beeinflussen (Davies et al., 1998). Durch Lokalisation und molekulare Charakterisierung der Zelladhäsionsmoleküle lässt sich heutzutage untersuchen, wie sie in die genetische Kontrolle physiologischer Vorgänge eingreifen.

1.4 Cadherine

Schwerpunkt dieser Arbeit sind die Cadherine. Sie wurden ursprünglich als Zelloberflächen-Glykoproteine identifiziert, die für Ca^{2+} -abhängige homophile Zell-Zell-Adhäsion während der embryonalen Entwicklung verantwortlich sind (Yoshida and Takeichi, 1982, Peyrieras et al., 1983). Allein beim Menschen wurden bis heute mehr als 80 Cadherine identifiziert und bei Wirbeltieren sind sogar über 300 Proteine bekannt. Gemeinsam allen Cadherinen sind mehrere extrazelluläre Cadherin-Motive, die auch Ektodomänen genannt werden. Cadherine kommen in Desmosomen und „adherens junctions“ verschiedener Gewebe vor. In den letzten drei Jahrzehnten wurde gezeigt, dass sich die Rolle der Cadherine nicht nur auf die mechanische Adhäsion und Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten beschränkt. Vielmehr greift die Funktion der Cadherine auch in die embryonale Morphogenese, die Apoptoseinhibition, die Erhaltung der Zellpolarität und der Signaltransduktion ein. Eine adäquate Expression der Cadherine ist von entscheidender Bedeutung, für die Gewebeintegrität, denn sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Erzeugung von Signalen an der Zelloberfläche und beeinflussen dadurch die Zellfunktionen (Rowlands et al., 2000). Das Gleichgewicht in der Expression verschiedener Cadherine kann die Zelldifferenzierung

steuern, ebenso die Migration und das Überleben der Zellen in unterschiedlichen Umgebungen (Derycke and Bracke, 2004). Zellmigration ist ein Prozess, der während der Embryonalentwicklung, im erwachsenen Organismus und unter pathologischen Umständen zu sehen ist. Cadherine und besonders das neurale Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin spielen eine große Rolle in der Migration.

E-Cadherin, das vor allem in Epithelien vorkommt, ist das bestuntersuchte Cadherin. Das Protein umfasst 728 Aminosäuren und besteht aus einer extrazellulären Domäne mit fünf Ektodomänen, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne vermittelt die homophile und Ca^{2+} -abhängige Adhäsion (Nagar et al., 1996). Die intrazelluläre Domäne tritt mit verschiedenen Molekülen in Wechselwirkung. Über α - und β -Catenin wird der Cadherin-Catenin-Komplex gebildet und verbindet sich mit dem Aktin-Zytoskelett (Kemler, 1993). Die intrazelluläre Domäne besitzt eine stark phosphorylierte Region, welche für das Binden von β -Catenin und somit für die Funktion von E-Cadherin essentiell ist. Die Kontrolle und Aufrechterhaltung der normalen interzellulären Adhäsion wird von Cadherin-Catenin-Komplex reguliert (Takeichi, 1991).

Verschiedene Untersuchungen belegten, dass E-Cadherin eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des differenzierten Epithels spielt (Rowlands et al., 2000). Karzinom-Zelllinien vom epitheliale Phänotyp exprimierten E-Cadherin und wuchsen nicht-invasiv. Hingegen Karzinom-Zelllinien mit Fibroblasten-ähnlicher-Morphologie waren in der Regel invasiv, und es konnte keine E-Cadherin-Expression festgestellt werden. Die Transfektion solcher Zellen mit E-Cadherin cDNA bewirkte einen epithelioiden Charakter und die Reduktion des invasiven Potentials (Nagafuchi et al., 1987, Frixen et al., 1991, Vleminckx et al., 1991). Antikörper, die die Adhäsivfunktion des E-Cadherin blockieren, verstärken das invasive Potential der Zellen (Behrens et al., 1989). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der Verlust von E-Cadherin-vermittelter Zelladhäsion eine Reihe von Ereignissen einleitet, die Epithelzellen in invasive Fibroblasten-ähnliche Zellen transformieren. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Cadherin-Dysfunktion oder -Verlust, die Tumorentstehung fördert (Sommers et al., 1991, Yap, 1998). Somatische Genmutationen des E-Cadherin in Tumorzellen und in Tumoren des Reproduktionstraktes unterstützen die Annahme, dass E-Cadherin ein wichtiger Suppressor der Tumorprogression und Metastasierung ist (Birchmeier et al., 1995, Wu et al., 2008, De Santis et al., 2009, Yoshida et al., 2009). Der Verlust von E-Cadherin-vermittelter Zelladhäsion kennzeichnet den Übergang aus normalem Epithel in ein wenig differenziertes Karzinom (Christofori, 2006, Jeanes et al., 2008, van Roy and Berx, 2008, Yang and Weinberg, 2008). Zellen ohne E-Cadherin verlieren ihre Polarität, werden

invasiv und apoptoseresistent. Weniger E-Cadherin bedeutet weniger Zell-Zell-Adhäsion und erhöht die Mobilität der Zelle.

Auch andere Cadherine spielen bei der Tumorprogression eine Rolle. Bei einer malignen Neoplasie tritt eine de novo Expression von N-Cadherin an. Wenig differenzierte Tumorzellen, die mesenchymalen Zellen ähneln, können das mesenchymale Zelladhäsionsmolekül N-Cadherin exprimieren (Gravdal et al., 2007, Grinberg-Rashi et al., 2009, Prudkin et al., 2009, Tomita et al., 2000). Somit ist es gut vorstellbar, dass der Verlust von E-Cadherin mit der Reexpression von N-Cadherin in Karzinomzellen korreliert. Wenige Studien haben die N-Cadherin-Expression in Ovarialtumoren evaluiert. N-Cadherin wurde in benignen, borderline als auch malignen Tumoren nachgewiesen (Darai et al., 1998, Sivertsen et al., 2006). Bisher gibt es keine Korrelation zwischen N-Cadherin-Expression und Tumorstadium oder Metastase (Marques et al., 2004). Ungefähr ein Drittel der Ovarialtumoren exprimiert ein positives Immunsignal für E- und N-Cadherin (Hudson et al., 2008). Genmutationen von E-Cadherin und β -Catenin wurden in Endometriumkarzinomen identifiziert (Fukuchi et al., 1998, Risinger et al., 1994).

1.5 OSE, Ovarialkarzinom und IFN- γ

Normale OSE-Zellen der erwachsenen Frau haben keine spezifischen Marker. Sie bilden die Keratintypen 7, 8, 18 und 19, welches das typische Keratinmuster für einfache Epithelien repräsentiert. Die OSE-Zellen exprimieren das mucinantigen MUC1, 17 β -hydroxysteroid Dehydrogenase und besitzen Zilien, die beim Peritonealepithel fehlen (Nicosia and Johnson, 1984, Blaustein and Lee, 1979). OSE-Zellen haben zahlreiche Mikrovilli und endozytotische Vesikel, die die Flüssigkeit- und Partikelabsorption erlauben (Blaustein and Lee, 1979, Perez et al., 1991). Die OSE-Zellen sind durch Desmosomen, Integrine (Kruk et al., 1994, Cruet et al., 1999), „gap junctions“ sowie inkomplette „tight junctions“ (Ribeiro et al., 1983), und Cadherine (Sundfeldt et al., 1997) verbunden. Die E-Cadherin-Expression in humanem OSE ist selten und beschränkt sich auf die Regionen mit hochprismatischen Zellen also dort, wo OSE-Zellen den Phänotyp des metaplastischen Epithels annähern, besonders in Inklusionszysten (Auersperg et al., 2001). Im Gegensatz zu anderen Epithelien ist die epitheliale Integrität der humanen OSE-Zellen primär von N-Cadherin abhängig (Wong et al., 1999).

Im Gegensatz zu den meisten Karzinomen, haben primäre gut differenzierte Ovarialkarzinome die besondere Eigenschaft epitheliale Charakteristika wieder zu gewinnen, indem es zu einer Zunahme der E-Cadherin-Expression kommt. Beispielsweise wird bei neoplastischer Progression in einen differenzierten Phänotyp eine hohe E-Cadherin-

Expression in OSE-ausgekleideten Inklusionszysten beobachtet (Maines-Bandiera and Auersperg, 1997). Die Analyse von Tumoren und Zelllinien, die sich aus menschlichen OSE ableiten, ergibt eine Korrelation zwischen Tumorgenese und E-Cadherin-Expression. So wurde in weiter fortgeschrittenen Tumoren und während der Progression zur Metastasierung ein Erlangen von mesenchymalen Funktionen mit gleichzeitigem Verlust von E-Cadherin beobachtet. Eine Abnahme oder Verlust der E-Cadherin-Expression geht mit einer Zunahme der invasiven Wachstumspotenz von Tumorzellen einher, welche dann nur N-Cadherin exprimieren.

Eine Grundvoraussetzung für die Metastasierung des Ovarialkarzinoms ist die Ablösung einzelner Zellen vom Primärtumor und deren Ansiedlung im Peritoneum. Von dort aus gelangen sie auf dem Blut- oder Lymphweg in andere Organe, wo sie Ausgangspunkt für Metastasen sein können. Starke Adhäsionsmechanismen sorgen im normalen Epithel dafür, dass eine unkontrollierte Ablösung von Einzelzellen verhindert wird. Hier spielt das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin eine wesentliche Rolle, denn solange dieses funktionell aktiv ist, kommt es zu keiner Ablösung. Schipper et al. (1991) berichteten über die positive Korrelation von funktionell inaktivem E-Cadherin und der Tumorgenese. Die Ko-Expression von E- und N-Cadherin in humanen OSE-Zellen verweist auf die Differenzierung des metaplastischen in einem neoplastischen OSE.

1.6 Aufgabenstellung und Ziele

Um das Verständnis über die Pathogenese des Ovarialkarzinomes zu verbessern, wurden die biologischen Eigenschaften des OSE untersucht. Die Gewinnung und die Kultivierung der OSE-Zellen musste zunächst etabliert werden. Die Gewinnung der humanen OSE-Zellen erfolgte in situ, da die Fallzahlen der Ovariectomien gering sind und demzufolge zur Verzögerung der Materialgewinnung führen würde. Durch Abstreichen der Ovaroberfläche während einer Operation sollten die humanen OSE-Zellen gewonnen werden. Ebenso sollte bei bovinen Ovarien nach Beschaffung aus dem Schlachthof vorgegangen werden.

Da Cadherine eine Schlüsselrolle bei der Metastasierung des Ovarialkarzinoms spielen können, sollte bei bovinen und humanen OSE-Zellen die Expression von E- und N-Cadherin sowie β -Catenin studiert werden. Viele klinische Arbeiten haben den positiven therapeutischen Effekt von IFN- γ beim Ovarialkarzinom bewiesen (Pujade-Lauraine et al., 1996, Windbichler et al., 2000, Marth et al., 2006). Da der Tumor von OSE ausgehen soll stellte sich die Frage nach dem IFN- γ Effekt auf OSE-Zellen. Besonderes Interesse galt den Zell-Zell-Kontakten der OSE-Zellen vor und nach der Stimulation mit IFN- γ .

Die vorliegende Arbeit hinterfragte, ob sich das Cadherinmuster unter IFN- γ Behandlung bei bovinen und humanen OSE-Zellkulturen ändert. Die Charakterisierung humaner und boviner OSE-Zellen sollte Hinweise über Funktion und evtl. karzinogene Rolle geben.

Die Aufgabenstellung war wie folgt:

1. Primäre OSE-Kulturen von bovinen und menschlichen Ovarien etablieren.
2. Konfluente Kulturen mit speziesspezifischem IFN- γ zu stimulieren oder als Kontrollen unbehandelt belassen; E-Cadherin, N-Cadherin sowie β -Catenin mit immunzytologischen Färbungen und Western Blot Analyse nachweisen.
3. Das OSE intakter Ovarien auf E- und N-Cadherin zu färben.
4. Durch Permeabilitätsversuche mit Meerrettichperoxidase (HRP) zeigen, dass IFN- γ Einfluss auf die Dichte der Zell-Zell-Kontakte von OSE-Zellen hat.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial, Geräte

Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	J.T. Baker, Griesheim
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Standard	Pierce, Bonn
Alkohol absolut	Apotheke des Klinikums, Leipzig
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Ammoniumperoxydisulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua dest.	Delta Select, Dreieich
BSA (Fraktion V)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Merck, Darmstadt
DAPI	SERVA Elektrophoresis, Heidelberg
DF ⁺ Medium	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Endothelial Cell Growth Medium MV	Promo Cell, Heidelberg
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin, alkoholisch	Schandon, Frankfurt am Main
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
FKS	Biochrom, Berlin
Gelatine	Merck, Darmstadt
Hämalaun nach Mayer	Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH, Leipzig
HCl rauchend	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Horseradish peroxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Interferon- γ , rekombinant bovin	CIBA-GEIGY, Basel, Schweiz
Interferon- γ , rekombinant human	Dianova, Hamburg
Kollagenase Typ 4	Worthington, Cell System Biotechnology, Lakewood, USA
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaHCO ₃	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 4%, gepuffert	Apotheke des Klinikums, Leipzig
PBS	Apotheke des Klinikums, Leipzig
PBS (ohne MgCl ₂ und CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PSA	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Ponceau S	ICS Biomedicals GmbH, Frankfurt am Main
Saccharose	Merck, Darmstadt
SIGMA FAST 3,3'-Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Temed	Roth, Karlsruhe
Tris Ultra	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Lachema, Tschechei

Trypsin/EDTA	Invitrogen-Gibco, Karlsruhe
Tween 1,25%	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Whatman Nitrozellulose Transfer Membran PROTRAN®	Biometra, Göttingen
Vectastain Elite ABC-Kit	Vector Laboratories, Burlingame USA
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ziege Normal Serum	DAKO, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
96 Well-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser (60 x 24 mm), rund	Menzel Gläser, Braunschweig
Filterpapier Whatman	Schleicher & Schuell
Glasflaschen Schott	Schott, Mainz
Objektträger Super Frost Plus (76 x 26 mm)	Menzel Gläser, Braunschweig
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Quarzglas Präzisionsküvetten	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße 0,2, 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen 75 ml	Sarstedt, Nümbrecht
24 Well Zellkulturplatten Nunclon Surface	Nunc, Langenselbold
Companion-Platte 24-Well (mit Zentrimer-Nuten für den Einsatz von Membraneinsätzen)	BD Falcon, Heidelberg
Zellkulturinsets mit PET-Membran (mit 0,4 µm Porengröße)	BD Falcon, Heidelberg

Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Analysewaage PJ300	Mettler
Alpha Imager™ 2200	Alpha Innotec Corporation
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 240	Heraeus, Hanau
Eismaschine Scotsman AF-80	Scotsman Eismaschinen, Erfurt
Eistruhe HFC86	Heraeus, Hanau
Entwicklungsgerät CURIX 60	AGFA, Köln
Gel-Apparatur Western-Blot	Bio-Rad, München
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments
Mikroskop LSM 510 META	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert S100	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Kamera AxioCam MRc5	Carl Zeiss, Jena
Monochromator Spectra Max M5	Molecular Devices, Ismaning/München
Multi Image™ Light Cabinet	Alpha Innotec Corporation
pH-Meter MultiCal pH526	WTW, Niederkassel-Rheidt
Photometer SpectraMax Plus 384	Molecular Devices, Ismaning/München
Präparierbank Hera Safe Type HS 15	Heraeus, Hanau
Reinstwassersystem Clear	SG Uni Equip GmbH
Schütteltisch Heidolph Rotamax 120	Heidolph Instruments
Spannungsgerät Power Pac HC™	Bio-Rad, München

Spektralphotometer UV/VIS Spectra Max Plus 384	Molecular Devises, Ismaning/München
Sterilbank Hera Guard Type HHP 18	Heraeus, Hanau
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Trans Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Transfer Gerät Western-Blot	IKA Werke, Staufen
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin, Bandelin
Vortexgerät MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Zentrifuge SORVALL SUPER T21	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Software

Software	Bezugsquelle
AxioVision Version Rel. 4.5	Carl Zeiss, Jena
Image Access 4.0	Carl Zeiss, Jena
LSM 5 Image Browser Rel. 4.2	Carl Zeiss, Jena
SigmaPlot 11.0	Systat Software, Erkrath
SoftMax Pro Software	Molecular Devises, Ismaning/München

2.1.2 OSE-Zellen und Ovarien

Das OSE humaner Ovarien wurde mit einem sterilen Wattetupfer sanft abgenommen. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät hatte das Projekt (Aktenzeichen: 079-2009-20042009) genehmigt. Die Patientinnen der Frauenklinik der Universität Leipzig waren präoperativ während eines ärztlichen Gespräches aufgeklärt worden und hatten ihre Einverständniserklärung schriftlich gegeben.

Es wurden zusätzlich bovine Ovarien auf dem Schlachthof Altenburg/Thüringen nach dem Ableben der Tiere präpariert; und der Transport der Ovarien erfolgte in eiskaltem PBS (ohne $MgCl_2$ und $CaCl_2$) in das Labor. Die bovinen Oberflächenepithelzellen wurden auf gleiche Art gewonnen wie die humanen Oberflächenepithelzellen.

2.2 Methode

2.2.1 Kultivierung

Angaben für die Herstellung des Mediums und der Pufferlösungen sind der Tab. 1 zu entnehmen.

Die Tupfer mit Patientinnenabstrichen wurden in sterilem DF⁺-Medium abgespült und danach wurde das zellhaltige Medium im Labor für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit frischem humanem Kulturmedium durch mehrmaliges Pipittieren resuspendiert. Jeder Abstrich bzw. Probe wurde in 4 Wells einer 24-Well-Platte ausgesät. Die weitere Aufzucht und nachfolgende Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator.

Die bovinen Ovarien wurden erneut in PBS gespült und anschließend mit in 0,05% Kollagenase (vorher in 37°C Wasserbad erwärmt) getränkte Wattetupfer abgestrichen. Die Wattetupfer wurden anschließend in 10 ml DF⁺-Medium „gequirrt“.

Ein Tag später wurden die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen und dann mit neuem Kulturmedium versetzt.

Passagieren und Stimulation mit IFN- γ

Das Passagieren der Epithelzellen erfolgte mit subkonfluenten Kulturen. Nach Abziehen des Mediums und anschließender Spülung mit der HEPES-Gebrauchslösung wurde zur Zellkultur 1 ml 0,05% Trypsin/0,02% EDTA zugegeben (3-5 min bei 37°C). Die mechanische Lösung der Zellen erfolgte durch Klopfen am Kulturflaschenboden. Zum Abstoppen der Trypsin/EDTA-Wirkung wurden 3-5 ml 37°C warmes Kulturmedium dazugegeben. Die Zellsuspension wurde in 15 ml Falcon-Röhrchen (5 min bei 1200 U/min) zentrifugiert und das Pellet mit 3-5 ml warmen Kulturmedium resuspendiert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage abgesaugt und durch 5 ml neues Kulturmedium ersetzt. Um die Zellproliferation zu verfolgen und Kontaminationen durch Pilze und Bakterien zu erkennen, kontrollierte man die Zellkulturen täglich unter dem Phasenkontrastmikroskop.

Konfluente Zellkulturen in 24-Wellplatten wurden 1:4 gesplittet und mit einer Zellzahl von 400 000 Zellen in 75 ml Kulturflaschen überführt. Die Zellzählung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer durch Anfärbung vitaler Zellen mit 0,4% Trypanblau. Zwei bis drei Wochen nach Aussaat stand ein subkonfluenter Monolayer zur Verfügung. Es wurden Zellen der Passagen 3 bis 4 verwendet und diese wurden entweder mit 200 U/ml rekombinantem, speziesspezifischem IFN- γ für 72 h stimuliert oder allein mit dem Kulturmedium.

Tab. 1: Medien und Pufferlösungen in der Zellkultur

Medien und Pufferlösungen	Zusammensetzung
DF ⁺ -Medium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 1+1 gemischt mit Ham's F-12 Medium pH 7,2 enthält: + L-Glutamine +15 mM HEPES + NaHCO ₃ auf 1 l Aqua Braun
1,5 M HEPES	23,8 g HEPES 90 g NaCl auf 1 l Aqua dest.
HEPES-Stammlösung	10 ml 1, 5 M HEPES + 140 ml 9% NaCl
HEPES-Gebrauchslösung	HEPES Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
1 M NaHCO ₃	84 g NaHCO ₃ /1l Aqua dest.
PSA	4,8 g Penicillin 10,8 g Streptomycin 1 g Ampicillin für 100 ml Medium 600 µl PSA zugeben
bovines Kulturmedium	DF ⁺ -Medium + 5% FKS + 2,2% 1 M NaHCO ₃ + PSA
humanes Kulturmedium	DF ⁺ -Medium + 5% FKS + 2,2% 1 M NaHCO ₃ + 6% Endothelial Cell Growth Medium MV + PSA
PBS (ohne MgCl ₂ und CaCl ₂)	9,55 g/l Aqua dest.
0,5% Trypsin / 0,2% EDTA (Stammlösung 10x)	mit HEPES-Gebrauchslösung verdünnen
Kollagenase (223 U/mg)	in Aqua dest. lösen und verdünnen

2.2.2 Immunhistologische Färbungen

Prinzip der Immunfärbung

In der Immunhistochemie/Immunhistologie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von Antigenen am histologischen Schnitt, in Zellkulturen, im Blut, Liquor, etc. sichtbar zu machen. Zur Detektion des Primärantikörpers wird der Sekundärantikörper benötigt, der gegen die konstanten Regionen des primären Antikörpers gerichtet ist. Der Sekundärantikörper ist mit Detektoren gekoppelt und kann an Fluorochrome (Immunfluoreszenz-Technik) oder Enzyme (Immunhistologie) binden. Diese werden histochemisch lokalisiert. Paraffinschnitte und Zellkulturen wurden mit verschiedenen Antigenen mit der Immunfluoreszenzlokalisation unter Verwendung bestimmter Puffer und Antikörper untersucht (Tab. 2 und 3). Für die Immunhistochemie sind die Angaben in den Tab. 4 und Tab. 5 zu finden.

Färbung mit der Immunfluoreszenz-Technik

Protokoll:

Die Zellkulturen wurden auf runden Deckgläsern kultiviert und bei Konfluenz gefärbt. Die Zellen wurden für 3 min mit einer Formaldehyd/Triton-Lösung fixiert und permeabilisiert. Danach wurde dreimal für 5 min zuerst mit Pufferlösung A und anschließend mit Pufferlösung B gespült. Der Erstantikörper wurde in einem Antikörperpuffer gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde mit Pufferlösung A und hinterher dreimal für 5 min mit Pufferlösung B gespült. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls im Antikörperpuffer gelöst und für 30 min auf den Zellen belassen. Danach wurde dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Hinterher wurde mit DAPI-Lösung versetzt und anschließend dreimal für 5 min mit Aqua dest. gespült. Die Deckgläser wurden bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und mit Entellan eingedeckt. Als Färbekontrolle wurden Kulturen ohne Inkubation mit dem Erstantikörper mitgeführt, um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers an den Zellen zu überprüfen.

Tab. 2: Pufferlösungen für Immunfluoreszenzfärbungen

Lösungen	Zusammensetzung
Formaldehyd/Triton-Lösung	1 ml 4% Formaldehyd/1 ml Aqua dest. 0,2 % Triton
Pufferlösung A	1 mg BSA/1 ml PBS 0,1% Triton
Pufferlösung B	1 mg BSA/1 ml PBS
Antikörperpuffer für Immunfärbung	10 mg BSA/1 ml PBS
DAPI-Lösung	1 µl DAPI/1 ml PBS

Tab. 3: Primär- und Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Primärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Inkubation
Anti-E-Cadherin	BD Biosciences, Heidelberg	1:100	über Nacht.
Anti-N-Cadherin	BD Biosciences, Heidelberg	1:100	über Nacht.
Anti-β-Catenin	BD Biosciences, Heidelberg	1:100	über Nacht.
Anti-Cytokeratin	Biomedicals AG, Augst, Schweiz	1:1000	über Nacht.
Anti-Vimentin	Serva, Heidelberg	1:400	über Nacht.
Sekundärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Inkubation
goat-anti-mouse Cy3	Dianova, Hamburg	1:200	30 min

Immunhistologie mit der ABC-Methode an Paraffinschnitten

Mittels Pinzette und Skalpell wurde zunächst ein Teilstück des bovinen Ovars entnommen, mit 4% Formaldehyd fixiert und vier h fließend gewässert. Mit Hilfe eines Einbettgerätes Shandon Citadel 1000 wurden die Ovarien in einer Kunststoffkassette in Paraffin eingebettet.

Dazu wurden sie innerhalb von 15 h über die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 2x 100% Alkohol), Xylol I, II, III in Paraffin überführt. Die Ausrichtung der Ovarien erfolgte so, dass die Längsachse des Oberflächenepithels getroffen wurde.

Die humanen Paraffinschnitte wurden aus dem Institut für Pathologie von Prof. Horn zur Verfügung gestellt und stammten von Patientinnen mit Ovarialkarzinomen. Routinemäßig wurde das Material in der Pathologie mit Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet.

Von jedem Paraffinblock wurden mit Hilfe des Schlittenmikrotoms Microm HM 500 M mehrere 7 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und in einem erwärmten Wasserbad auf beschichtete Superfrost-Objektträger aufgezogen und zum Trocknen über Nacht bei 37°C gestellt.

Die immunhistochemische Färbemethode ist die sogenannte Avidin-Biotin-Complex- (ABC-) Methode, welche von Hsu et al. (1981) entwickelt wurde. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Hierzu werden drei Reagenzien benötigt. Das erste ist ein unkonjugierter Primärantikörper, der spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichtet ist, sowie ein biotinylierter Sekundärantikörper, welcher sich an den ersten Antikörper anlagert. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex, markiert mit HRP. Das Enzym Peroxidase wird mit einem geeigneten Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) sichtbar, unter Bildung eines braunen Reaktionsproduktes. Die eingesetzten Antikörper und Pufferlösungen sind den Tab. 4 und Tab. 5 zu entnehmen.

Tab. 4: Primär- und Sekundärantikörper für immunhistochemische Färbungen

Primärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Inkubation
Anti-E-Cadherin	BD Biosciences, Heidelberg	1:400	über Nacht
Anti-N-Cadherin	BD Biosciences, Heidelberg	1:300	über Nacht
Sekundärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Inkubation
BA 9200-anti-mouse	Vector, Biozol	1:200	30 min

Tab. 5: Pufferlösungen für Immunhistochemie

Pufferlösungen	Zusammensetzung
0,05M Tris gepufferte NaCl-Lösung (TBS) (10x Stammlösung)	60 g Tris-Puffer 87 g NaCl + 1 l Aqua dest. mit 25% HCl pH auf 7,6 einstellen bei 4°C lagern
Tris-EDTA-Lösung pH 9,0	1,21 g Tris-Base 0,37 g EDTA + 1 l Aqua dest. + 0,5 ml Tween 20 bei 4°C lagern
TBS 0,05 M	100 ml 10x Tris HCL plus 900 ml Aqua dest.
TBS Tween	1,25 ml Tween auf 1 l TBS
Antikörper-Puffer	10 mg BSA in 1 ml PBS
3% Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	90 ml Aqua dest. plus 10 ml 30% H ₂ O ₂ frisch herstellen
3% Ziege Normal Serum	45µl Ziege Normal Serum auf 1,5 ml TBS
ABC-Komplex	2,5 ml 0,05 M TBS plus 1 Tropfen Lösung A plus 1 Tropfen Lösung B (30 min vorher ansetzten)
DAB-Reagenz	1 Tablette DAB und 1 Tablette Urea H ₂ O ₂ in 1 ml Aqua dest. lösen

Protokoll:

1. Entparaffinieren der Paraffinschnitte über Xylol I, II und III für jeweils 8 min, eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70% für jeweils 5 min) und Rehydrieren in Aqua dest. für 1 min
2. 5 min bei 95°C mit Tris EDTA-Lösung in der Mikrowelle erhitzen für E-Cadherin (für N-Cadherin 20 min).
3. Abkühlen auf RT für ca. 15 min
4. Dreimal mit PBS für jeweils 5 min spülen
5. Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit 3% H₂O₂ für 15 min im Dunkeln
6. Zweimal mit TBS Tween und zweimal TBS 0,05 M für jeweils 4 min spülen
7. Blockierung mit 3% Ziege Normal Serum für 30 min
8. Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht in der Feuchtkammer
9. Zweimal mit TBS Tween und zweimal TBS 0,05 M für jeweils 4 min spülen
10. Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei RT in der Feuchtkammer
11. Spülen zweimal mit TBS Tween und zweimal TBS 0,05 M für jeweils 4 min
12. Inkubation mit dem ABC-Komplex für 30 min in der Feuchtekammer.
13. Zweimal mit TBS Tween und zweimal TBS 0,05 M für jeweils 4 min spülen
14. Einmal mit PBS für 4 min spülen
15. Visualisierung von gebundener Peroxidase mit DAB 15 min bei RT unter Laborabzug.

16. Mit PBS und dann mit Aqua dest. kurz spülen
17. Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer für 12 sec
18. Zweimal mit Wasser spülen.
19. Unter fließendem Wasser für 10 min spülen zum Bläuen der Zellkerne.
20. Entwässerung über die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) bis Xylol I, II, und III.
21. Mit Kanadabalsam eindecken.

2.2.3 Zellkultur für die Western Blot Analyse (Tab. 6 und 7)

Extraktion und Konzentrationbestimmung der Proteine

Die Zellen stationärer Kulturen wurden in HEPES mit einem Zellschaber von den Böden der Kulturflaschen abgeschabt. Die abgelösten Zellen wurden für 5 min bei 1.200 U/min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Extraktionspuffer (Tab. 7) aufgenommen. Danach erfolgte der mechanische Aufschluss der Zellen durch Ultraschallbehandlung (20 s, 5 Zyklen; Ultraschallprozessor UW2200). Die Lysate wurden bei 13.000 U/min (10 min, 4°C; Biofuge fresco, Rotor 3325 B) zentrifugiert und vom resultierenden Überstand die Proteinkonzentration bestimmt.

Es wurde zusätzlich eine verkürzte Proteinextraktionsmethode benutzt. Dafür wurden Zellen auf 6-Well-Platten kultiviert. Hierbei wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 50 µl Probenpuffer in jedes Well zugegeben. Die Zellen wurden mit Zellschaber von den Plattenböden abgeschabt, und die Lysate wurden in die Eppendorf-Tubes aufgenommen. Die Proteine wurden durch Ultraschallbehandlung (20 s, 5 Zyklen; Ultraschallprozessor UW2200) sonifiziert und 15 min bei 95°C im Thermomixer denaturiert. Danach wurde die Proteinkonzentration der Proben wie folgt bestimmt.

Als Standard diente eine BSA Reihe (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, und 125, 25 µg/ml) um den Proteingehalt zu bestimmen, Aqua dest. diente als Leerwert. Es wurde das BCA Protein Assay Reagent von der Firma Pierce verwendet. Es erfolgte je eine Doppelbestimmung. Pro Well einer 96-er Platte wurden 20 µl Aqua dest., BSA-Standard oder die Probe pipitiert. Anschließend wurden 200 µl der gemischten Reaktionslösung des BCA Protein Assay (Reagenz A und B 1:50) in jedes Well pipittiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wird die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch vorhandene Proteine in einem alkalischen Milieu (Biuret Reaktion) als violette Färbung sichtbar. Die Bestimmung der Absorption erfolgt mit einem Spektralphotometer bei 562 nm. Der Proteingehalt der Proben wird mit Hilfe der BSA-Eichreihe und einer Proteinbestimmungsoftware Pro Soft in µg/ml bestimmt.

Polyacrylamidgelelektrophorese

Der Western Blot diente der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine oder Gewebe-Lysate nachgewiesen werden. Nach Auftrennung der Proteine, im elektrischen Feld werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zweiten Antikörper, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym (Peroxidase oder Phosphatase) gekoppelt ist, detektiert.

Die Auftrennung der Proteine geschah mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Mit Hilfe dieser SDS-PAGE kann ein Proteingemisch aufgrund der verschiedenen molekularen Massen der einzelnen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Die Eigenladung der Proteine wird durch die anionische Ladung des SDS überdeckt, dadurch wandern sie im elektrischen Feld zum Plus-Pol, wobei sie sich nach ihrer Größe auftrennen.

Tab. 6: Pufferlösungen

Pufferlösungen	Zusammensetzung
Proteinextraktionspuffer pH 7,8	10 mM Tris-HCl 1 Mm EDTA 1 Mm MgCl ₂ 0,02% Triton X-100 1 :100 PMSF 1 :100 Proteinase Inhibitor Cocktail
Probenpuffer (3 x)	2,95 g Tris-Base 6 g SDS 30 g Saccharose 100 ml Aqua dest Alle Reagenzien bei 60°C auflösen und pH auf 6,8 einstellen. Die Stocklösung kann mit Aqua dest. verdünnt werden.
Tris-HCl pH 6,8 – oberer Puffer	60,5 Tris-Base in 800 ml Aqua dest. pH auf 6,8 einstellen, ad. Aqua dest. 1,0 l
Tris-HCl pH 8,8 – unterer Puffer	90,85 Tris-Base in 450 ml Aqua dest. pH auf 8,8 einstellen 2 g SDS ad. Aqua dest. 500 ml
Waschpuffer (1 Liter)	100 ml 10x Tris-HCl 900 ml Aqua dest. 3 ml Tween 0,5 ml Triton-X100
10 x Tris-HCl (0,5 M)	60,5 g Tris-HCl 87,6 g NaCl 500 ml Aqua dest. pH auf 8,0 einstellen ad Aqua dest. 1 l

Laufpuffer	3 g Tris-Base 14,4 g Glycin 10 ml 10%ige SDS-Lösung 1 l Aqua dest.
Transferpuffer (2 Liter)	5,8 g Glycin (39 mM) 11,6 g Tris-Base (48 mM) 0,74 g SDS (0,037%) 400 ml Ethanol (20%)
Laemmli-puffer	0,28 ml Mercapthoethanol 4 ml Glycerol 3,2 ml Oberer Puffer 1,5 ml Aqua dest. 1 ml 10% SDS 1 Stückchen Bromphenolblau
Antikörperlösung für Western-Blot	0,5 g BSA in 100 ml Waschpuffer
Blocklösung (5%ige Milchpulver-Lösung)	5 g Milchpulver in 100 ml Waschpuffer
10%ige SDS-Lösung	10 g SDS in 100 ml Aqua dest.
10%ige APS-Lösung	10 g APS in 100 ml Aqua dest.
PMSF-Lösung	8,7 mg PMSF in 10 ml Ethanol
Striplösung	40 ml 10%ige SDS-Lösung 33,33 ml Tris-HCl (oberer Puffer pH 6,8) 1,4 ml Mercaptoethanol 200 ml Aqua dest.
Ponceau S rot	0,1 g Ponceau S in 100 ml 0,5%ige Essigsäure

Für die SDS-PAGE wurde eine Apparatur von Bio-Rad verwendet. Es wurden zwei mit Alkohol gereinigte Glasplatten mit 0,75 Spacer eingesetzt. Zunächst wurde das Trenngel (10%) entsprechend der in der Tab. 7 verzeichneten Angaben gemischt und in der Vorrichtung gegossen. Zur Polymerisation wurde mit Isopropanol überschichtet. Nachdem die Polymerisation abgeschlossen war ca. 20-30 min, wurde das Isopropanol abgegossen und mit Aqua dest. gespült. Direkt im Anschluss wurde das Sammelgel (4%) gemischt, gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Das Sammelgel verfügt aufgrund des geringeren Acrylamidanteils über eine größere Porenweite und dient somit der Aufkonzentrierung der Proteine vor der Trennung. Wenn ca. 30 min auch das Sammelgel vollständig polymerisiert war, wurde die Elektrophorese-Apparatur (Mini Trans-Blot® Cell, Biorad) zusammengebaut. Die Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer gefüllt, und die Kämme wurden aus den Gelen gezogen. Um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu erreichen wurden die Proteinextrakte (jeweils 25 µg) mit 6 µl β-Mercaptoethanol-erhaltene Laemmli-puffer gemischt und aufgekocht für 5 min bei 95°C im Thermomixer. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und auf die Gele aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker diente ein biotinylierter Protein Marker mit einer Bandbreite von 200 kDa-10 kDa von der Firma CellSignalling. Davon wurden pro Gel 5 µl in die erste Tasche aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V und wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblau-Bande das untere Ende des Gels erreicht hatte, also nach ungefähr eine Stunde.

Tab. 7: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Lösungen	10% Trenngel	4% Sammelgel
30% Acrylamid-Bisacrylamidlösung	3,33 ml	0,65 ml
Tris-HCl pH 6,8 (oberer Puffer)	-	1,25 ml
Tris-HCl pH 8,8 (unterer Puffer)	2,5 ml	-
H ₂ O	4,13 ml	3,05 ml
10% SDS	-	50 µl
10% APS	30 µl	25 µl
TEMED	6,67 µl	5 µl
Endvolumen (für 2 Gele)	10 ml	5 ml

Western Blot Analyse

Um die über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, müssen die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden wie z.B Nylon- oder Nitrozellulosemembranen. Für die Übertragung der Proteine mit der Western Blot Technik vom Trenngel auf Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) wurde das Semidry Blot Verfahren verwendet (Blotkammer Trans Blot Semidry Transfer Cell, Biorad). In Vorbereitung des Blots wurden je Gel 8 Filterpapiere und eine Membran, die der Größe des Gels entsprechend zugeschnitten waren, mit Transferpuffer getränkt. Für den Blot wurden je Gel 4 Filterpapiere, die Membran, das Gel und noch mal 4 Filterpapiere luftblasenfrei übereinander gelegt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 15 V für 1 h.

Die Vollständigkeit der Proteinübertragung konnte durch Anfärben der Proteinbanden mit Ponceau-S-Lösung überprüft werden. Dazu wurde die Membran für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zweimal mit PBS-Puffer gewaschen zur Entfärbung des Hintergrundes. Vor der Inkubation mit spezifischen Antikörpern, wurde die Nitrocellulosemembran in Blocklösung für 1 h im RT zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen inkubiert.

Für den immunchemischen Proteinnachweis wurde die Membran nach der Inkubation mit Waschpuffer gewaschen, anschließend erfolgte die Zugabe des Antigen-spezifischen Primärantikörpers über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde nicht gebundener Antikörper durch 6-faches Waschen für jeweils 6 min in Waschpuffer entfernt. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde für 1 h bei RT auf der Membran belassen. Nach einem finalen Waschschrift von 36 min in denen alle 6 min ein Waschpufferwechsel erfolgte, wurde die Membran mit 4 ml ECL-Lösung versetzt und die Chemilumineszenz mit einem Hyperfilm detektiert. Um auf derselben Membran den Nachweis zur gleichmäßigen Proteinbeladung zu erbringen, musste der Primär- und Sekundärantikörper nach der Detektion entfernt werden. Hierzu wurden die Membranen in Striplösung für 1 h bei 50°C in Wasserbad inkubiert. Danach wurde für 15 min gewaschen und Blocklösung für 1 h im RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des maus-anti- β -Aktin-Antikörpers über Nacht auf einem Schüttler bei 4°C. Am nächsten Tag nach einem Waschschrift von 36 min erfolgte die Inkubation vom Sekundärantikörper für 1 h bei RT auf der Membran. Nach erneutem Waschen konnte die Zweitdetektion durchgeführt werden.

Tab. 8: Primär- und Sekundärantikörper für Western Blot Analyse

Primärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Inkubation
Anti-E-Cadherin	BD Biosciences, Heidelberg	1:3000	über Nacht bei 4°C
Anti-N-Cadherin	BD Biosciences, Heidelberg	1:3000	über Nacht bei 4°C
Anti- β -Catenin	BD Biosciences, Heidelberg	1:100000	über Nacht bei 4°C
Anti-Vimentin	Serva, Heidelberg	1:100000	über Nacht bei 4°C
Anti-Cytokeratin-8	Progen, Heidelberg	1:4000	über Nacht bei 4°C
β -Aktin-monoklonal	Calbiochem, USA	1:10000	über Nacht bei 4°C
Sekundärantikörper	Bezugsquelle	Verdünnung	Inkubation
Peroxidase anti-mouse IgG	Vector Laboratories Burlingame, USA	1:10000	1 h bei RT

2.2.4 Messung der Permeabilität (Tab. 9)

Für die Messung der Permeabilität von HRP bei OSE-Kulturen mit und ohne IFN- γ Behandlung (Fukushima et al., 2001, Ricken et al., 1996) haben folgende Versuche stattgefunden.

Die subkonfluenten Kulturen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und mit einer Zelldichte von 7500 pro mm² Insert (Filtereinsatz) (oberes Kompartiment) (Gesamtzellzahl von 250000 pro Insert) auf 24-Well-Companion-Platten ausgesät. Die Inserts waren mit transluzenten „High Density Polyethylenterephthalat (PET-Membranen)“ mit einer Porengröße von 0,4 μ m versehen. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der konfluenten Kulturen mit IFN- γ stimuliert und die andere Hälfte diente als Kontrolle. Nach 72 h wurden 250 μ l HRP-Lösung in das Insert und 600 μ l Medium in das untere Kompartiment zugegeben. Während die Platten vorsichtig geschüttelt wurden, wurden 50 μ l Medium Proben aus dem unteren Fach in Abständen von jeweils 1, 2 und 3 h gesammelt und auf Eis aufbewahrt, bis die HRP-Aktivität mit der Methode von Herzog und Fahimi (1973) bestimmt werden konnte. Die Proben wurden dafür mit 2,9 ml DAB-Gelatine-Lösung gemischt. Die enzymatische Reaktion wurde mit 50 μ l H₂O₂-Lösung gestartet und im Dunkeln bei RT für 25 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung mit einem Spektralphotometer bei 465 nm gemessen und der Nullwert (DAB-Gelatine-Lösung mit DF⁺⁺ ohne HRP) abgezogen. Der Leerwert (DAB-Gelatine-Lösung mit DF⁺⁺ und H₂O₂) diente dem Eichen des Gerätes. Schließlich wurden die Membranen mit 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert und mit DAPI gefärbt um die Intaktheit der Monoschicht zu überprüfen.

Tab. 9: Lösungen für HRP-Versuche

Lösungen für HRP-Versuche	Zubereitung
DAB-Gelatine-Lösung	50 mg Gelatine in 25 ml Aqua dest. unter Wärme und Rühren lösen auf ZT abkühlen. 9 mg DAB in der Gelatine-Lösung lösen. 0,35g Citronensäure in 25 ml Aqua dest. lösen (0,2N). Diese 25 ml ebenfalls zu Gelatine-Lösung geben, gut mischen und pH Wert auf 4,3 einstellen. Lösung ist im Dunkeln bei 4°C einige Tage haltbar
H ₂ O ₂ -Lösung	1 ml 30% H ₂ O ₂ in 50 ml Aqua dest. lösen. Immer frisch ansetzen
HRP-Stammlösung	2mg HRP in 1 ml DF ⁺ lösen. Lösung bei -20°C im Dunkeln einige Tage haltbar.
HRP-Lösung	HRP-Stammlösung 1:25 verdünnt; 80 μ g/ml
DF ⁺⁺	DF ⁺ -Medium (Tab. 1, S. 13) und 2,2% 1 M NaHCO ₃

2.2.5 Bild- und Datenauswertung und statistische Bearbeitung

Die morphologische Dokumentation der Zellkulturen erfolgte an einem inversen Auflichtmikroskop (AxioPlan2, Zeiss). Die bildhafte Dokumentation erfolgte mittels des computergesteuerten Dokumentationssystems Image Access. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen wurde mittels des LSM Meta 510 aufgenommen. Der Cy3 (Indocarbocyanin)-gekoppelten Zweitantikörper konnte bei einem Exzitationsmaximum von 550 nm und einem Emissionsmaximum von 570 nm detektiert werden. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne ließen sich bei einem Maximum der Emission von 460 nm nachweisen. Die immunhistologischen Präparate wurden mit dem Mikroskop Axioplan 2 und der angeschlossenen Kamera Prog Res 3008 aufgenommen.

Die Western Blots wurden mit EPSON Perfection V500 Photo eingescannt. Alle Resultate sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente, wenn es nicht anders festgelegt ist. Die statistisch ausgewerteten Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung der Mittelwerte (SD) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Mann-Whitney U Test. Statistische Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaPlot 11.0 durchgeführt und Unterschiede wurden als statistisch signifikant bei $p < 0,05$ berichtet. Der τ -Test wurde nicht durchgeführt, weil es bei den bovinen Daten keine Normalverteilung gab. Die Berechnung der Messdaten erfolgte mit Microsoft Office Excel.

3 Ergebnisse

3.1 Bovine und humane OSE-Zellen bilden Monolayer

Mit Phasenkontrastaufnahmen wurde die Morphologie der OSE-Zellen aus den zwei Spezies dargestellt (Abb. 1). Unbehandelte bovine und humane OSE-Zellen zeigten das typische kompakte, pflastersteinartige Bild des epithelialen Monolayers (Abb. 1A und 1C).

Konfluente Kulturen wurden mit 200 U/ml rekombinantem, speziesspezifischem IFN- γ behandelt. Nach der Zytokinbehandlung erschienen die Zellkulturen in den Phasenkontrastaufnahmen nach wie vor vital. Auch die DAPI-Färbung zeigte intakte Zellkerne und keine apoptotischen Körperchen. Die Behandlung mit IFN- γ für 72 h verursachte dennoch eine veränderte Morphologie der Zellen (Abb. 1B und 1D). Die Zellen flachten ab, das pflastersteinartige Bild war weniger ausgeprägt. Die humanen Zellen zeigten eine längliche, spindelartige Form im Vergleich mit den bovinen behandelten Zellen, die ihre runde polygonale Form beibehielten. Vergleich man die bovine mit humanen Zellen, schien der Effekt von IFN- γ bei den bovinen stärker zu sein.

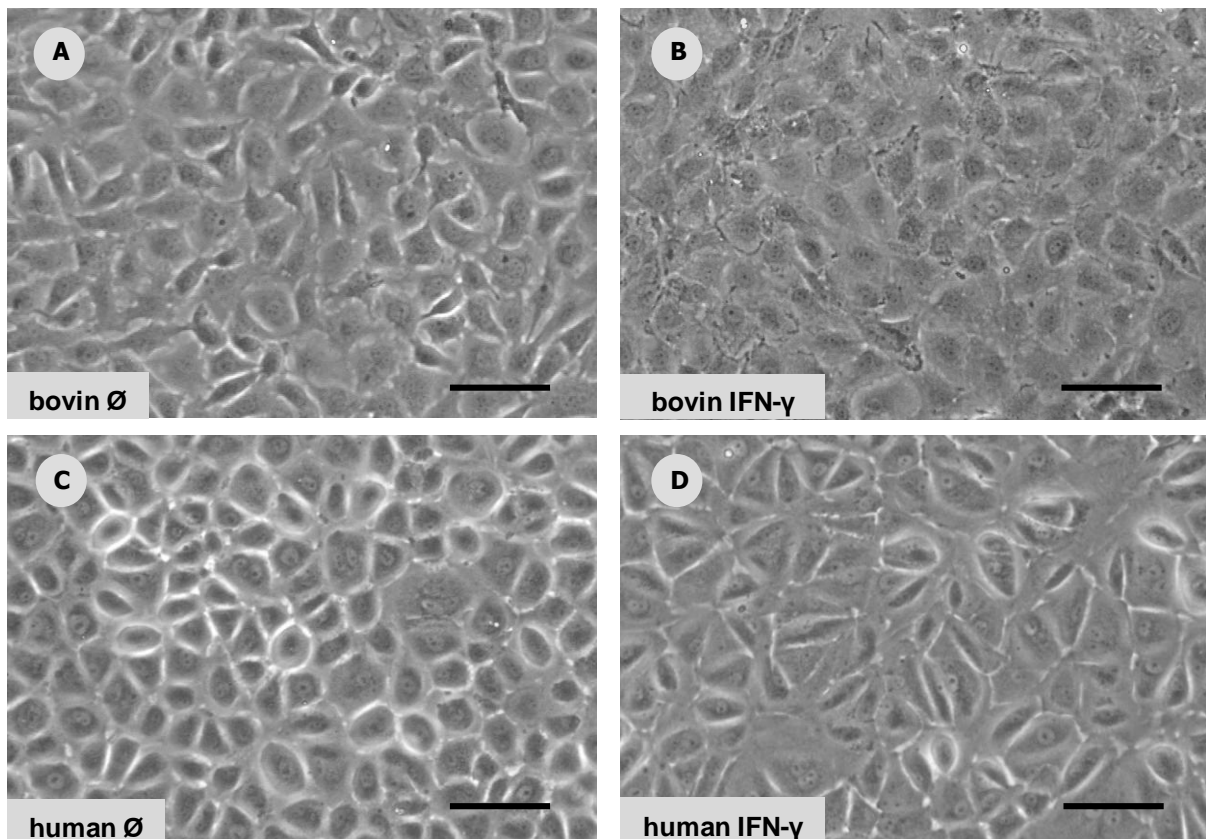


Abb. 1: Morphologie boviner und humaner OSE-Zellen im Phasenkontrastmikroskop

A, B Bovine OSE-Zellen jeweils als unbehandelte Kontrolle (A) und mit IFN- γ behandelt (B). C, D Humane OSE-Zellen jeweils als unbehandelte Kontrolle (A) und mit IFN- γ stimuliert (B). Bovine und humane OSE-Zellen flachten nach 72h Stimulation mit IFN- γ ab. Jedoch schien der Effekt von IFN- γ bei den bovinen Zellen stärker zu sein. Maßstab 100 μ m.

Im Folgenden wurde nach weiteren Unterschieden zwischen humaner und boviner OSE untersucht. Die Interzellularkontakte der OSE zwei verschiedener Spezies wurden behandelt und unbehandelt dargestellt. Dabei untersuchte man sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker. Zellkulturen beider OSE-Typen wurden mit Anti-Cytokeratin (Abb. 2), Anti-Vimentin (Abb.3) Anti-E-Cadherin (Abb. 5 und 6), Anti-N-Cadherin (Abb. 5 und 6) und Anti- β -Catenin (Abb. 7), die spezifischen Antigene immunzytologisch lokalisiert.

Bovine und humane OSE-Lysate mit und ohne Stimulation dienten zum Nachweis auf Proteinebene mit dem Western Blot Verfahren (Abb. 4 und 8).

3.2 Bovine und humane OSE-Zellen bilden Cytokeratin-Netzwerke

Beide OSE-Typen zeigten bei der Immunfluoreszenzfärbung für Cytokeratin eine positive Reaktion; dies offenbart sich durch die intensive Färbung der intermediären Cytokeratin-Filamente. Bei den unbehandelten bovinen OSE-Zellen waren die Filamente typischerweise perinukleär und im angrenzenden Zytoplasma zu finden; teilweise erreichten die Filamente gebündelt die Zellperipherie (Abb. 2A). Nach der Stimulation mit IFN- γ wurden die Filamente so stark entwickelt, dass das Bild an ein Spinnennetz erinnerte (Abb. 2B). Die Zellen zeigten einen festen Zusammenhalt und schienen näher zueinander zu sein.

Bei den humanen, unbehandelten OSE-Zellen lagen die Cytokeratin-Filamente dicht gepackt im zentralen und peripheren Zytoplasma (Abb. 2C). Gebündelte Filamente einer Zelle waren mit vergleichbarer Struktur der Nachbarzelle in Kontakt, wie man es für Desmosomen kennt (Abb. 2E). Nach 72 h Stimulation erschienen die Zellen größer als die unbehandelten Zellen und die Filamente länger (Abb.2D). Verglich man bovine mit humanen Zellen, schien der IFN- γ bedingte Effekt der Zellvergrößerung/Abflachung, bei den bovinen Kulturen wieder stärker zu sein. Denn nach der Stimulation zeigten die bovine Zellen im Gegensatz zu den humanen Zellen eine dramatische Zunahme des Cytokeratin-Netzwerkes, sowohl zentral als auch peripher.

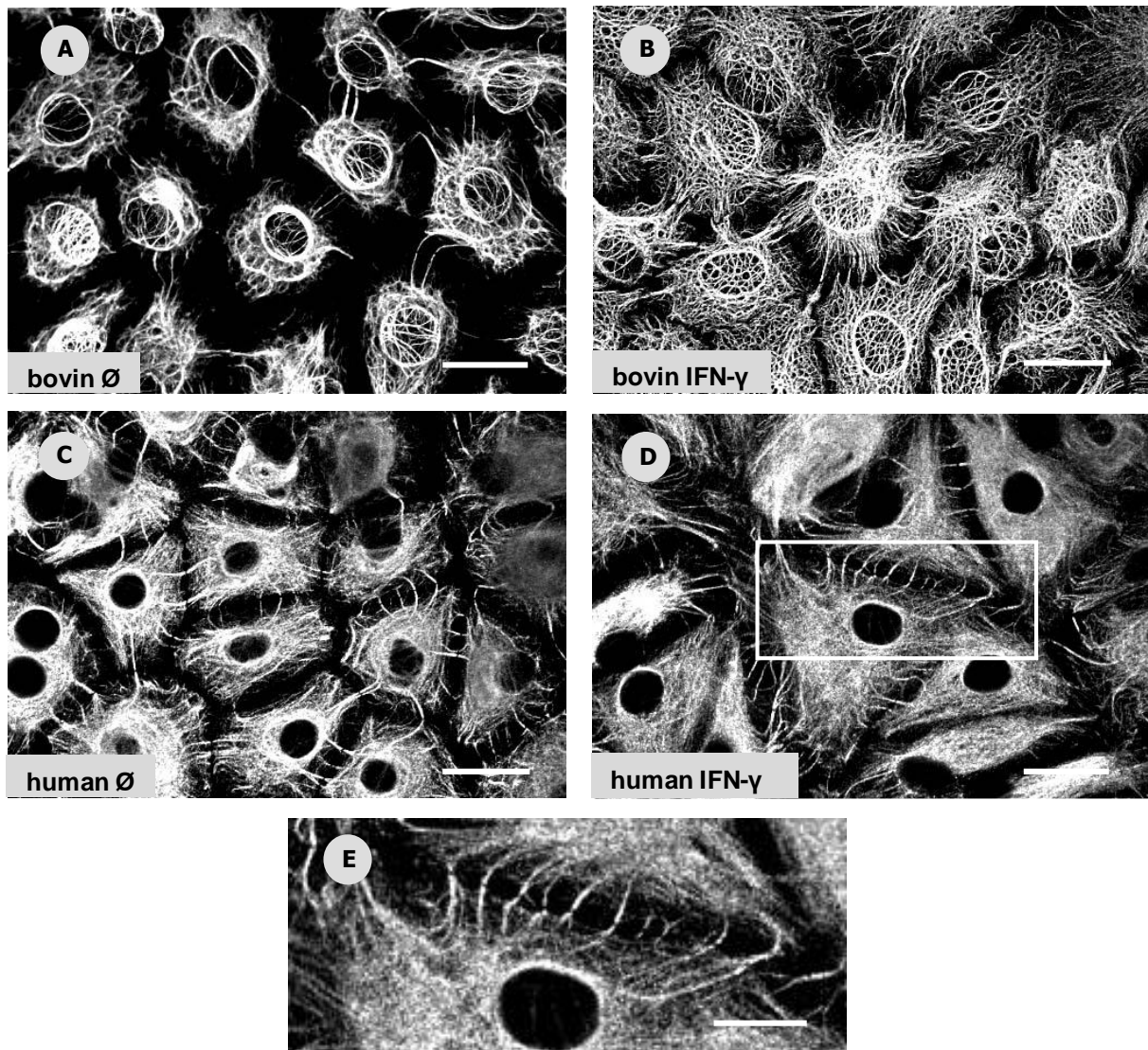


Abb. 2: Cytokeratinfärbung mit Immunfluoreszenz bei bovinen und humanen OSE-Zellen

Bovine OSE-Zellen jeweils als unbehandelte Kontrolle (A) und mit IFN- γ behandelt (B). Ebenso humane OSE-Zellen jeweils als unbehandelte Kontrolle (C) und mit IFN- γ stimuliert (D). Maßstab 20 μm . E Vergrößerung der Zell-Zell-Kontakte. Die Filamentbündel einer Zelle sind mit den Filamenten der benachbarten Zelle in Kontakt. Das Bild ist für Desmosomen typisch. Maßstab 10 μm .

3.3 Bovine und humane OSE-Zellen entwickeln Vimentin-Filamente

Beim Nachweis von Vimentin zeigte sich ein filamentäres Netzwerk sowohl bei den bovinen als auch den humanen OSE-Zellen (Abb. 3A und 3C). Die Anordnung der Vimentinfilamente war nicht vergleichbar mit den Cytokeratin-Filamenten, denn Zellbündel zur benachbarten Zelle fehlten. Der perinukleäre Ring, wie ihn unbehandelte Zellen bei der Cytokeratin-Färbung zeigten, war weniger intensiv entwickelt. Nach 72 h Stimulation mit IFN- γ zeigte sich bei beiden OSE-Typen eine Vergrößerung der Zelle im Vergleich zur unbehandelten Kultur, jedoch fehlten Veränderungen der Vimentinstruktur (Abb. 3B und 3D).

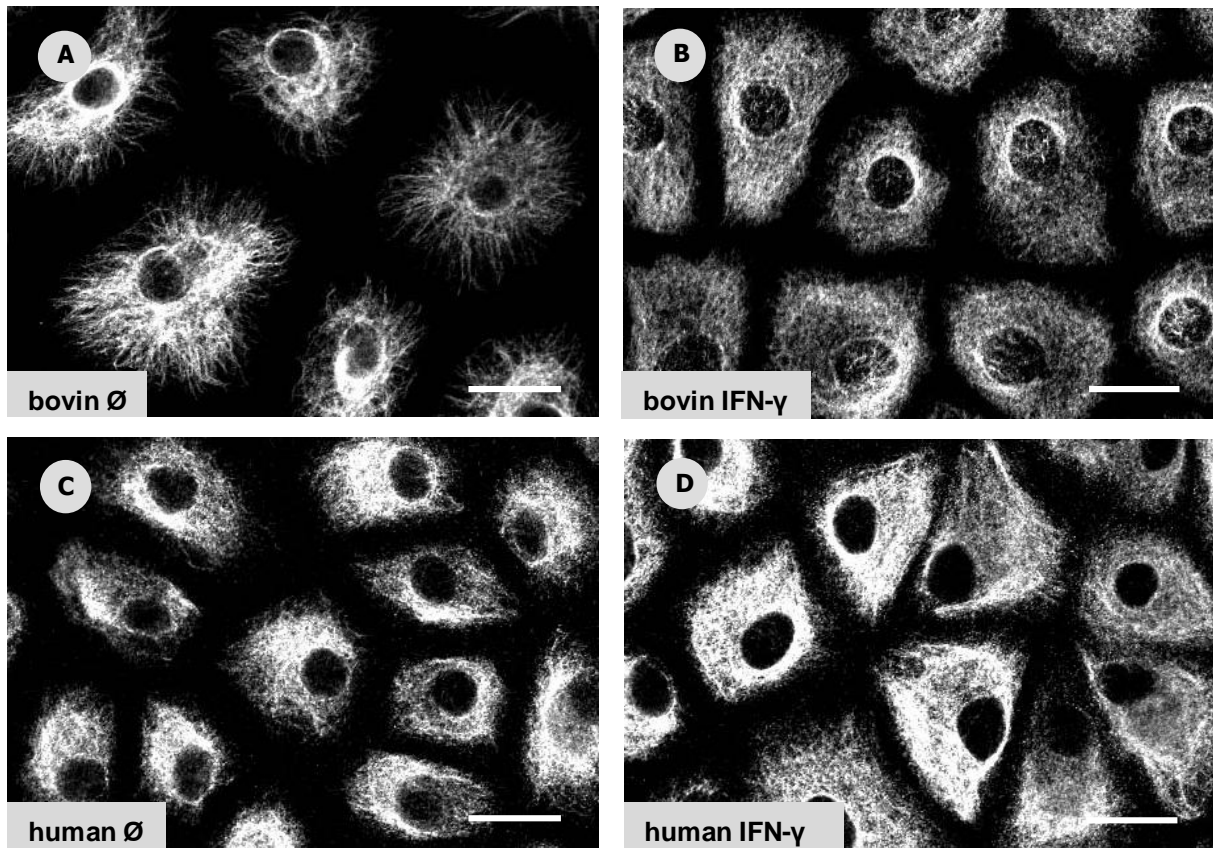


Abb. 3: Vimentinfärbung mit Immunfluoreszenz bei bovinen und humanen OSE-Zellen

Bovine OSE-Zellen jeweils als unbehandelte Kontrolle (A) und mit IFN- γ behandelt (B). Ebenso humane OSE-Zellen jeweils als unbehandelte Kontrolle (C) und mit IFN- γ stimuliert (D). Maßstab 20 μm .

In der **Western Blot Analyse** konnte ebenfalls sowohl für bovine als auch für humane OSE-Zellen ein positives Signal für Cytokeratin und Vimentin gezeigt werden (Abb. 4). Die interne Kontrolle für β -Aktin zeigte eine Doppelbande unter IFN- γ Behandlung. Diese wurden als Degradationsprodukte gedeutet (Abb. 8, S. 31).

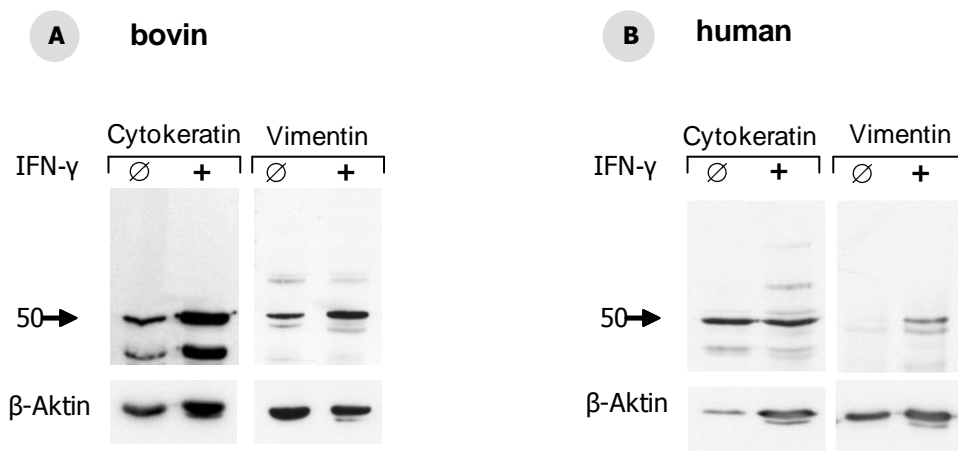


Abb. 4: Western Blot Analyse für Cytokeratin und Vimentin in unbehandelten und IFN- γ behandelten OSE-Kulturen.

β -Aktin zur Kontrolle der Proteinbeladung.

3.4 Bovine und humane OSE-Zellen unterscheiden sich in der Expression von E-Cadherin und N-Cadherin

Unbehandelte bovine OSE-Zellen zeigten in der Immunfluoreszenzfärbung ein punktuelles E-Cadherin-Immunsignal entlang der lateralen Zellmembran (Abb. 5A). Nach 72 h Stimulation mit IFN- γ wurde das punktuelle Muster durchgehend und stark verzahnt bei sichtbarer Zunahme des Immunsignals (Abb. 5B).

Die Immunfluoreszenzfärbung für N-Cadherin ergab bei bovinen OSE-Zellen vor und nach IFN- γ Stimulation ein negatives Signal (Abb. 5C). Es waren lediglich die mit DAPI-gefärbten Zellkernen zu erkennen (Abb. 5C, kleines Fenster). Um die Funktionalität des Antikörpers im bovinen System zu überprüfen, wurden Kontrollfärbungen mit unbehandelten bovinen Granulosazellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein eindeutiges Immunsignal für N-Cadherin an der lateralen Zellmembran (Abb. 5D).

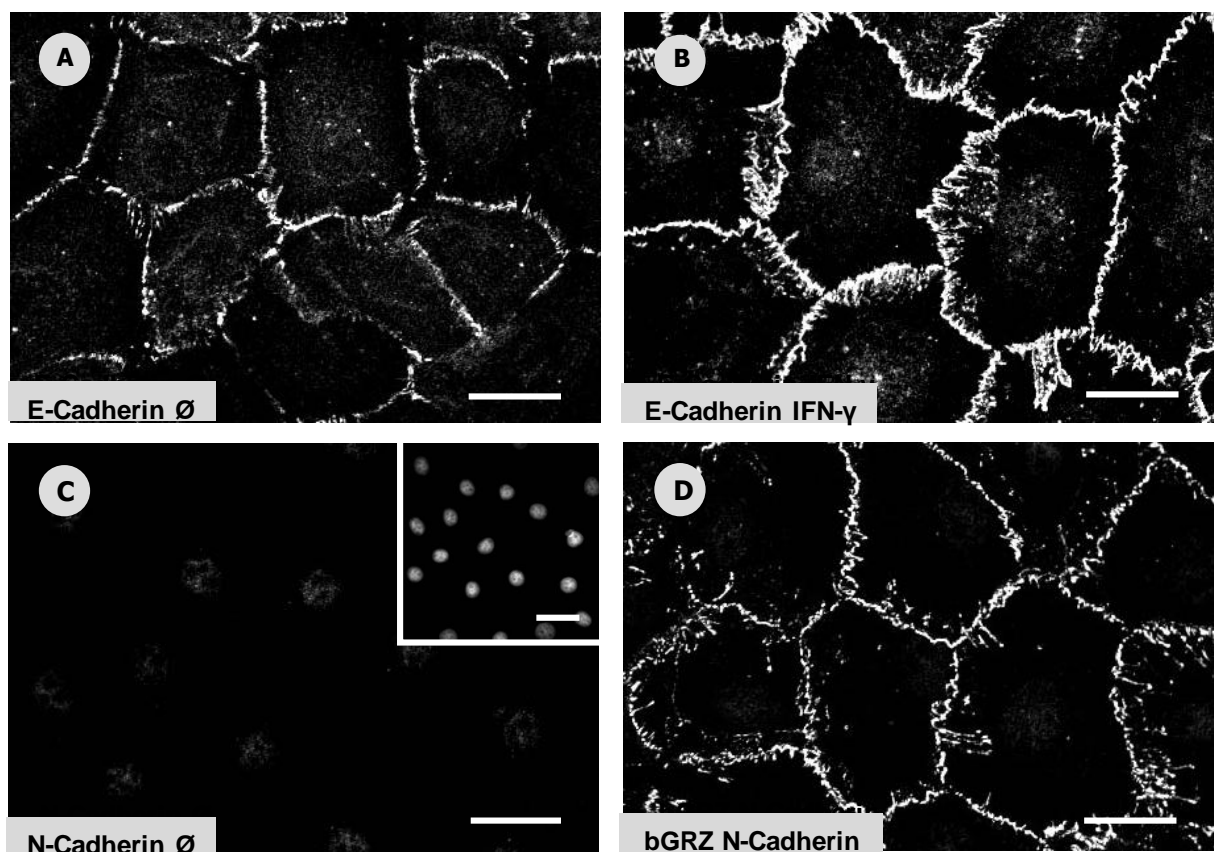


Abb. 5: Bovine OSE-Zellen exprimieren E-Cadherin, jedoch nicht N-Cadherin

Immunfluoreszenzfärbung als unbehandelte Kontrolle (A und C) und mit IFN- γ behandelt (B). E-Cadherin-Lokalisation (A und B); Abwesenheit von N-Cadherin in DAPI-gefärbter, unbehandelter Kultur (C). Maßstab des kleinen Fensters in C 30 μ m. Bovine Granulosazellen (GRZ) als Kontrolle für die N-Cadherin Färbung (D). Maßstab 20 μ m.

Im Gegensatz zu den bovinen OSE-Zellen zeigten humane OSE-Zellen sowohl für E- als auch N-Cadherin ein positives Signal. E-Cadherin konzentrierte sich dort, wo drei bis vier Zellen im Kontakt traten (Zell-zu-Zell-Ecken). Ein schwächeres, punktuell Signal fand sich entlang den lateralen Zell-zu-Zell-Kontaktseiten (Abb. 6A). N-Cadherin hingegen war gleichwertig an der lateralen Zellseite und den Zellecken zu finden (Abb. 6C). Nach Stimulation mit IFN- γ kam es zu einer Konzentration des E- und N-Cadherin-Immunsignals an den Zell-zu-Zell-Ecken (Abb. 6B und 6D). An manchen Stellen konnte bei den humanen, IFN- γ stimulierten Zellen ein Drüsenazinus-ähnlicher Komplex beobachtet werden (Abb. 6E).

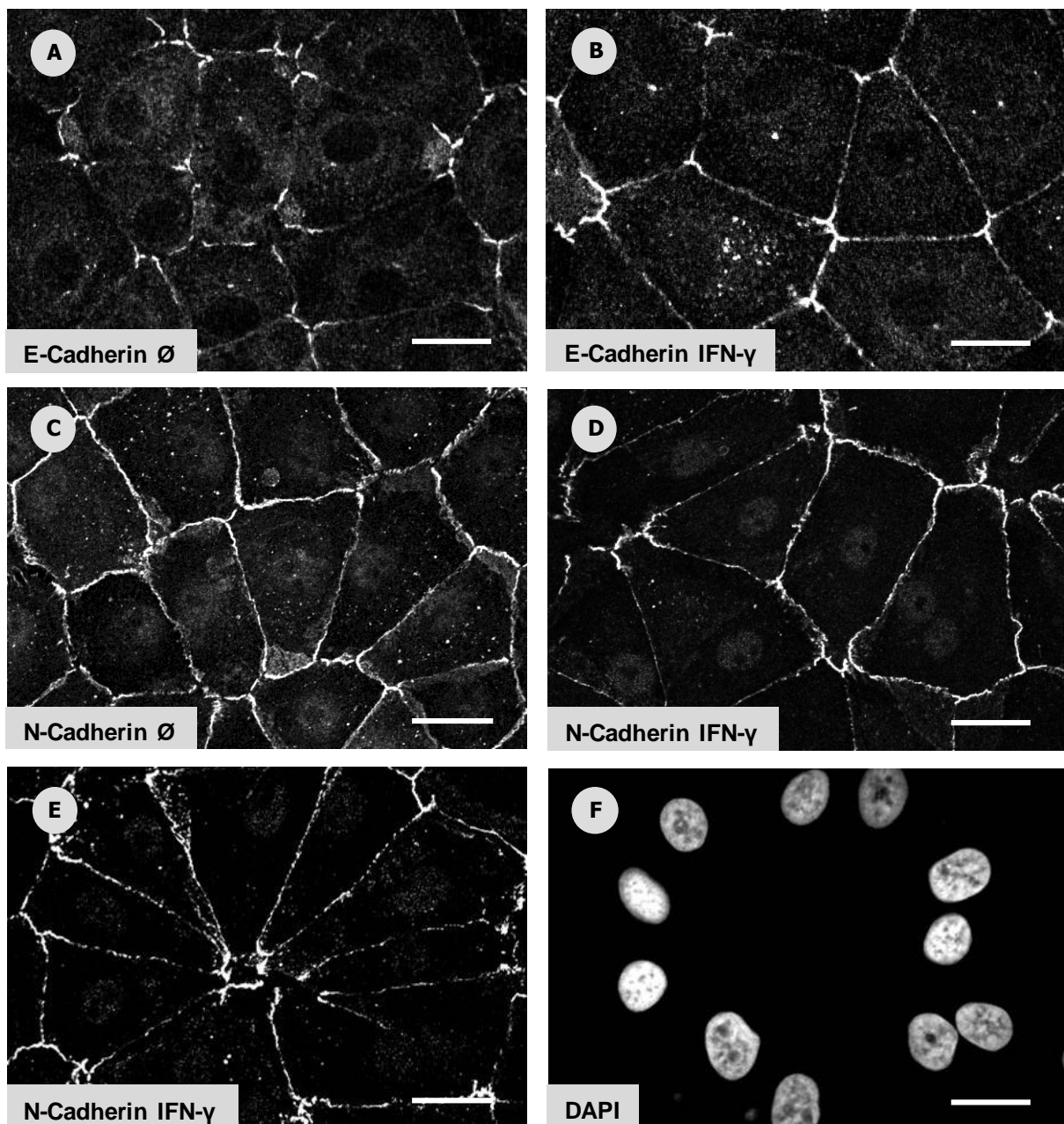


Abb. 6: Humane OSE-Zellen exprimieren E-Cadherin und N-Cadherin

Immunfluoreszenzfärbung jeweils als unbehandelte Kontrolle (A und C) und mit IFN- γ stimuliert (B, D und E). A und B für E-Cadherin, C, D und E für N-Cadherin. F DAPI-Färbung von E. Maßstab 20 µm.

3.5 Bovine und humane OSE-Zellen zeigen Unterschiede in der β -Catenin-Färbung

Die Immunfluoreszenzfärbung mit β -Catenin zeigte bei den bovinen OSE-Zellen ein punktförmiges, schwaches Muster (Abb. 7A). Es veränderte sich nach 72-stündiger Stimulation mit IFN- γ deutlich, indem das punktuelle Muster linear und intensiv wurde (Abb. 7B). Bei den humanen, unbehandelten Zellen zeigte sich ein starkes punktuelles Muster (Abb. 7C). Nach der Stimulation wurde das Signal durchgehend für die Zellen, die zusammengerückt waren (Abb. 7D). Erneut konnte man bei den humanen, IFN- γ stimulierten Zellen einen Komplex ähnlich einem Azinus beobachten, wie bei der Färbung mit N-Cadherin gezeigt wurde.

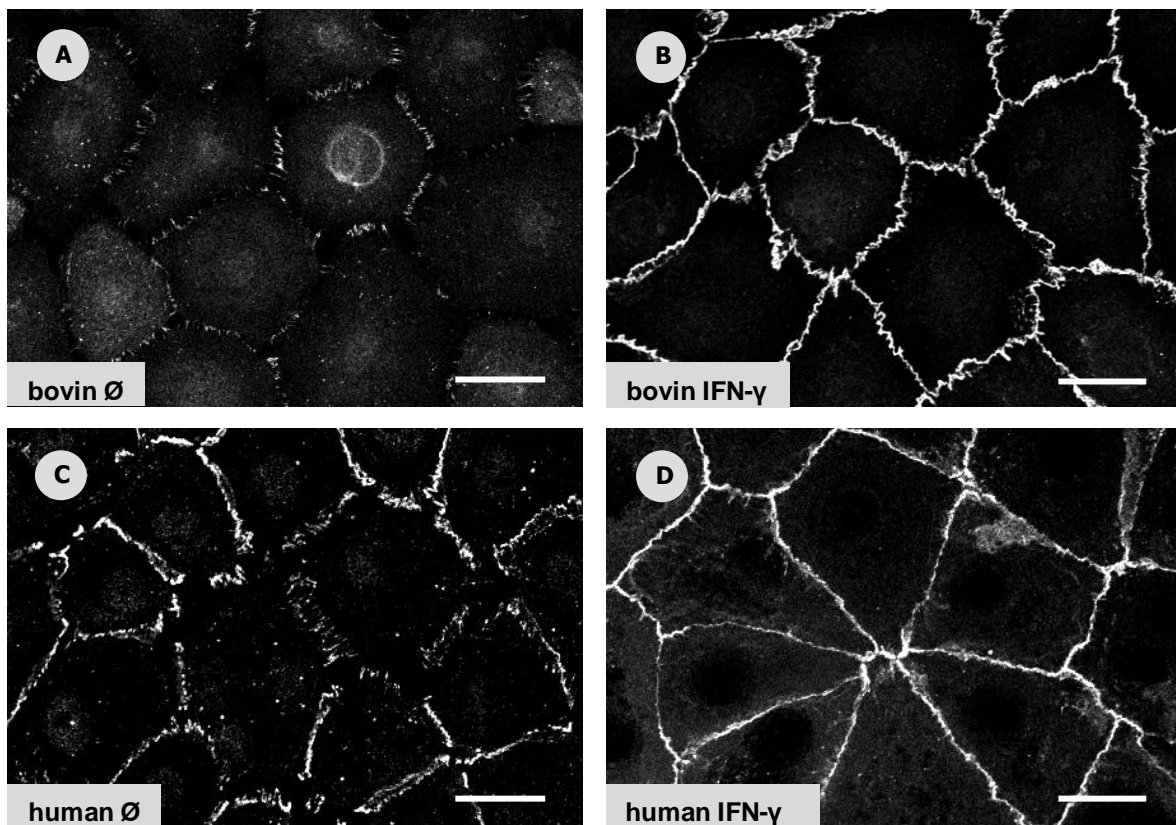


Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbung für β -Catenin-Expression bei bovinen und humanen OSE-Zellen

Bovine OSE-Zellen mit β -Catenin jeweils als unbehandelte Kontrolle (A) und mit IFN- γ behandelt (B). Ebenso für humane OSE-Zellen jeweils als unbehandelte Kontrolle (A) und mit IFN- γ stimuliert (B). Maßstab 20 μ m.

Die **Western Blot Analyse** bestätigte die Ergebnisse der Färbungen. Bei den unbehandelten bovinen OSE-Zellen zeigte sich eine deutliche Bande in der Höhe von 120 kDa (Abb. 8A). Die Position der Bande stimmte mit der zu erwartenden molekularen Masse des E-Cadherins von 120 kDa überein. Eine schwache Bande fand sich bei 90 kDa. Bei den unbehandelten, humanen OSE-Zellen zeigten sich hingegen zwei vergleichbar starke Banden: eine in Höhe

von 120 kDa und eine in der Höhe von 90 kDa (Abb. 8B). Zwischen unbehandelten und behandelten, bovinen sowie humanen Zellkulturen schienen Unterschiede in der Banden aufzutreten, denn die mit IFN- γ behandelten bovinen Zellen zeigten eine stärkere E-Cadherin Bande als die humanen, behandelten Zellen.

Eine N-Cadherin-Expression ließ sich zwischen unbehandelten und behandelten, bovinen OSE-Zellen nicht finden, während für unbehandelte Granulosazellen ein positives Signal bei 130 kDa zu erhalten war. β -Catenin (92 kDa) wurde von IFN- γ behandelten, bovinen OSE-Zellen gebildet. Bei humanen OSE-Lysaten waren die Signale für N-Cadherin und β -Catenin vorhanden und unter IFN- γ angestiegen.

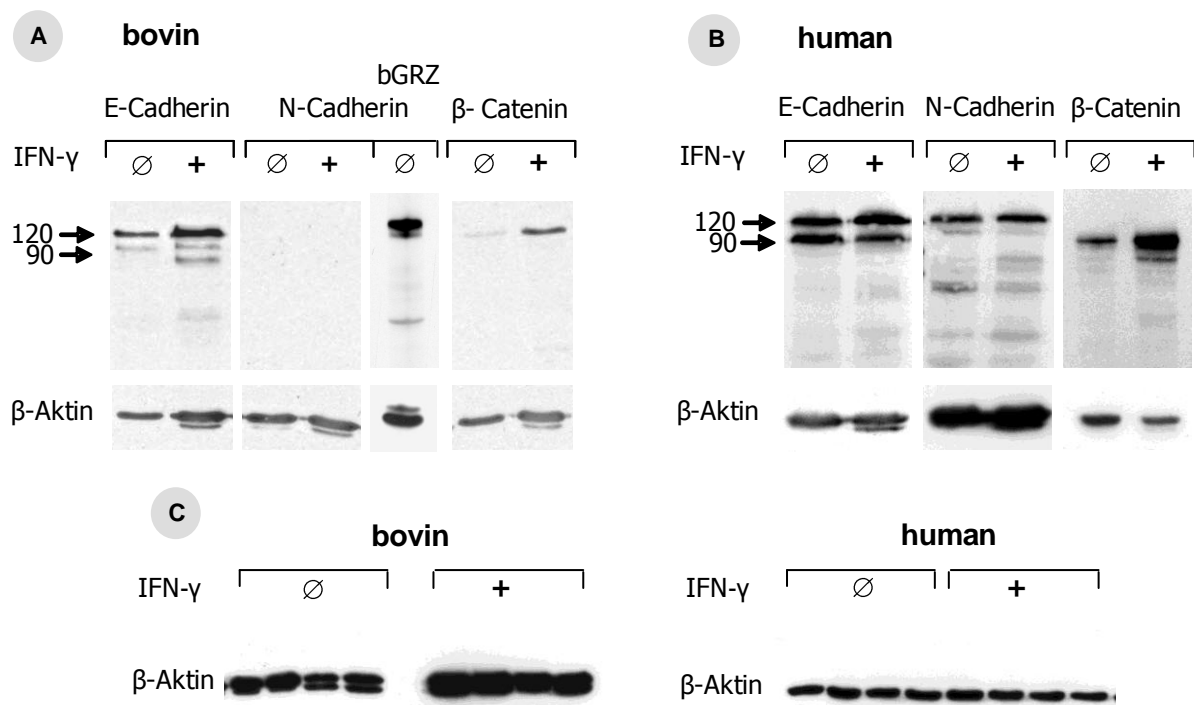


Abb. 8: Western Blot Analyse für bovine OSE in (A) und humane in (B). E-Cadherin, N-Cadherin und β -Catenin in unbehandelten und IFN- γ behandelten Kulturen.

β -Aktin zur Kontrolle der Proteinbeladung. bGRZ = bovine Granulosazellen. Die internen Kontrollen für β -Aktin zeigen Doppelbande vor allem unter IFN- γ Behandlung. (C) Bei der verkürzten Proteinextraktion wird im humanen System eine β -Aktinbande gefunden.

Die Doppelbanden beim β -Aktinnachweis wurden wie folgt gedeutet. Splice-Varianten, bedingt durch IFN- γ Behandlung schieden aus; da auch unbehandelte Kulturen die Doppelbande, wenngleich schwächer, zeigten. Naheliegend waren Proteinabbauprodukte infolge unzureichender Proteasehemmung während der Präparation. Bei der verkürzten Proteinextraktion (Material und Methode, S. 17) ergab sich für die humanen Kulturen eine β -Aktinbande, jedoch nicht für das bovine System (Abb. 8C). Weitere Kontrollen mit erhöhter Konzentration von Proteasehemmer blieben aus.

Alle Befunde wurden in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: Semiquantitative Auswertung aller Ergebnisse zum OSE anhand immunzytologischer Färbungen und Western Blot Analyse

	Cytokeratin	Vimentin	E-Cadherin	N-Cadherin	β -Catenin
b o v i n					
Ø	+++	++++	++	Negativ	++
IFN- γ	++++	++++	++++	Negativ	++++
h u m a n					
Ø	+++	++++	++	+++	+++
IFN- γ	+++	++++	++	+++	++++

3.6 Das intakte OSE des menschlichen Ovars bildet E- und N-Cadherin.

Das OSE des bovinen Ovars exprimierte im immunhistochemischen Bild E-Cadherin (Abb. 9A) und kein N-Cadherin (Abb. 9B). Die Granulosazellen eines antralen Follikels zeigten hingegen für beide eine positive Immunantwort diffus oder entlang der Zellgrenzen (Abb. 9C und 9D). Das OSE humaner Ovarien exprimierte dagegen beide Cadherine. Das einschichtige kubische Epithel zeigte für E-Cadherin (Abb. 9E) und N-Cadherin (Abb. 9F) eine positive Reaktion an der lateralen Zellgrenze.

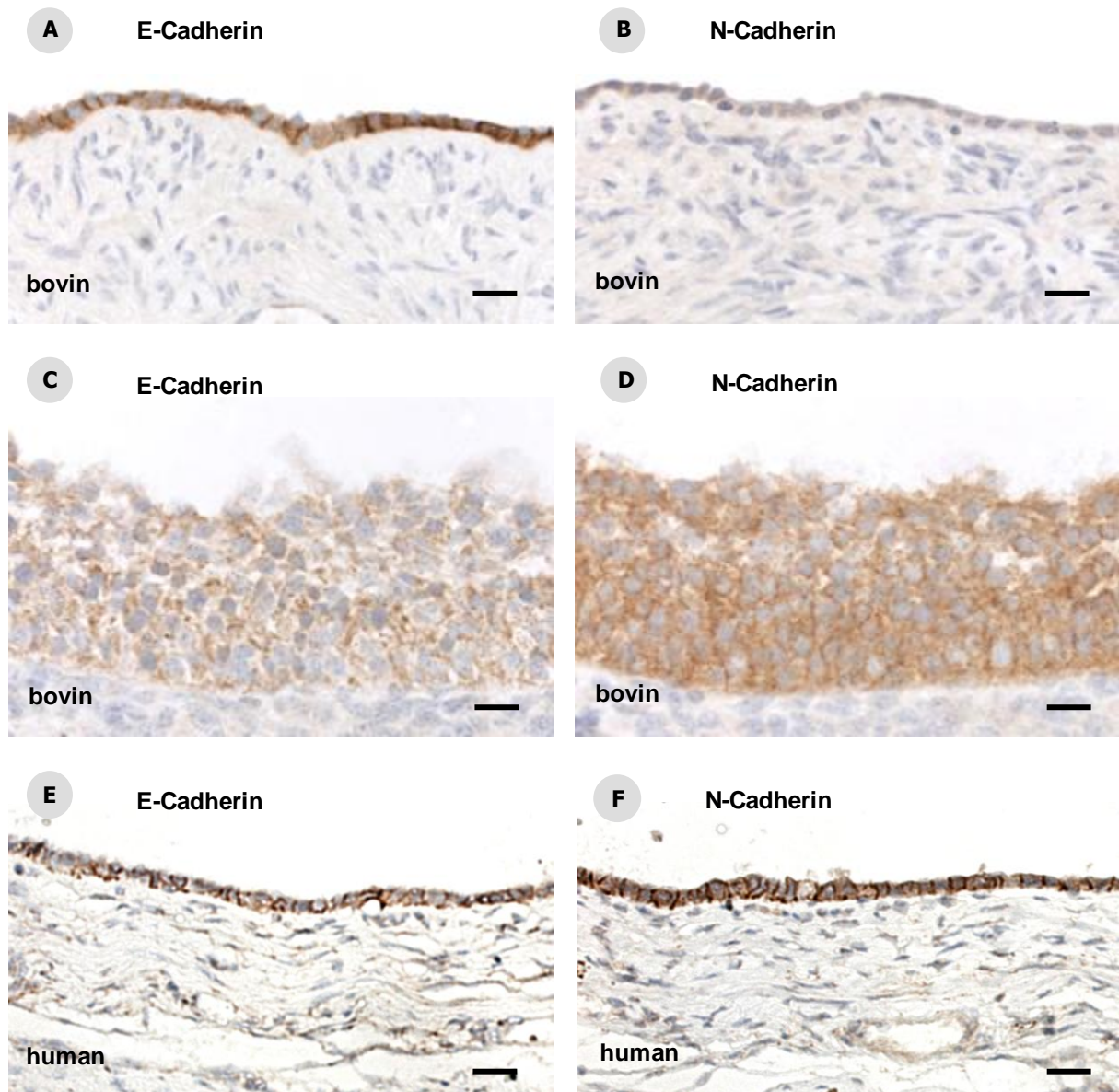


Abb. 9: Immunhistochemie für E- und N-Cadherin des OSE boviner und humaner Ovarien

A und B Cadherine im bovinen OSE, C und D bovine Follikeln mit Granulosazellen und E und F im humanen OSE. Maßstab 20 µm. Das intakte OSE des menschlichen Ovars bildet E- und N-Cadherin an der lateralen Zellmembran. Das bovine OSE hingegen exprimierte nur E-Cadherin.

3.7 Mit IFN- γ behandelte bovine OSE-Kulturen sind impermeabel für HRP

Mit dem Permeabilitätsversuch wurde überprüft, ob die unter IFN- γ beobachteten Veränderungen zu einer verstärkten Bildung der Zell-Zell-Kontakte führte. Ebenso sollten Unterschiede zwischen den beiden OSE-Typen von Kulturen auffallen.

In bovinen stimulierten OSE-Kulturen verringerte sich die HRP-Aktivität signifikant nach jeweils 1, 2 und 3 h im Vergleich zur unbehandelten Kultur (Abb. 10A). Der Durchfluss von HRP nahm in stimulierten, bovinen OSE-Kulturen mehr als 90% signifikant ab, bei der Kontrolle nahm die HRP-Aktivität steil zu. In humanen OSE-Kulturen stieg der Durchfluss von HRP nach 72 h Stimulation mit IFN- γ nahezu wie ohne Stimulation bei der Kontrolle (Abb. 10B). Es wurden keine signifikanten Unterschiede mit und ohne IFN- γ beobachtet. Behandelte und unbehandelte bovine und humane Zellkulturen waren am Ende des Experiments konfluent, welches durch Immunfluoreszenzfärbung der Aktin-Filamente kontrolliert wurde.

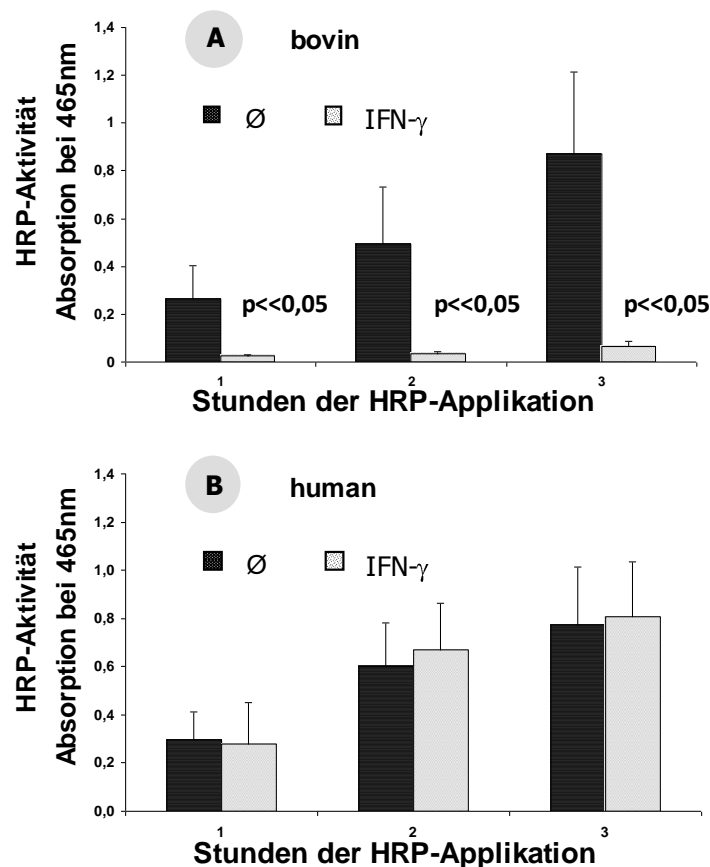


Abb. 10: Permeabilität für HRP in bovinen und humanen OSE-Zellkulturen

Die OSE-Zellen wurden im oberen Kompartiment zur Konfluenz gebracht und 72 h mit 200 U/ml IFN- γ behandelt. Die HRP-Aktivität bestimmte man im Medium des unteren Kompartiments. Die Mittelwerte mit \pm SD ergeben sich aus fünf unabhängigen Einzelversuchen. Nach 1, 2 und 3 h HRP-Zugabe stieg bei den bovinen unbehandelten OSE-Kulturen der HRP-Durchfluss konstant an. Bei den stimulierten OSE-Kulturen verringerte sich um mehr als 90%. Bei den humanen behandelten und unbehandelten OSE-Kulturen wurden hingegen keine signifikanten Unterschiede beobachtet.

Es ist bekannt, dass Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen unter IFN- γ aufgehen (Stolpen et al., 1986). Bei stimulierten, bovinen OSE-Zellen wurde das Gegenteil beobachtet. Es konnte die Möglichkeit bestehen, dass die Zell-Zell-Kontakte erst aufgehen und dann schließen. Deswegen wurden bei bovinen OSE-Kulturen auch frühere Zeitpunkte der Stimulation untersucht (Abb. 11). Die HRP-Permeabilität wurde 12 h und 60 h nach Stimulation überprüft, jeweils 3 h nach HRP-Applikation im oberen Kompartiment. Nach 12 und 60 h Stimulation war bei den unbehandelten OSE-Kulturen der HRP-Durchfluss nahezu gleich. Der Durchfluss von HRP nahm in stimulierten OSE-Kulturen nach 60 h stärker ab als nach 12 h und lag nahe dem Signifikanzniveau. Um die Reversibilität des IFN- γ -Effektes zu überprüfen, wurde 72 h nach Stimulation mit IFN- γ der Mediator entfernt und die OSE-Kulturen wurden mit frischem Medium für weitere 72 h ersetzt. Der HRP-Durchfluss stieg nach 144 h bei den unbehandelten OSE-Kulturen konstant an. Bei den stimulierten OSE-Kulturen hingegen war der HRP-Durchfluss niedrig.

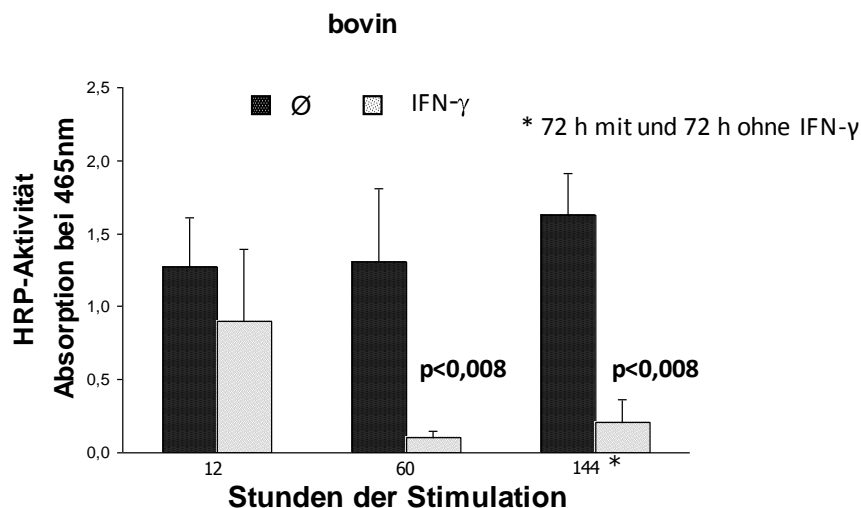


Abb. 11: Permeabilität für HRP in bovinen OSE-Zellkulturen 12 und 60 h nach Stimulation mit IFN- γ , sowie 72 h nach Stimulation und weiteren 72 h ohne IFN- γ .

Die OSE-Zellen wurden im oberen Kompartiment zur Konfluenz gebracht und für 12, 60 und 72 h mit 200 U/ml IFN- γ behandelt. Die Kulturen mit 72 h Stimulation wurden für weitere 72 h ohne IFN- γ belassen. Nach 3 h HRP-Zugabe wurde die HRP-Aktivität im Medium des unteren Kompartiments gemessen. Die Mittelwerte mit \pm SD ergeben sich aus fünf unabhängigen Einzelversuchen. Bei den unbehandelten OSE-Kulturen stieg der HRP-Durchfluss nach 12 und 60 h Stimulation konstant an. Bei den stimulierten OSE-Kulturen nahm die Permeabilität 60 h nach Stimulation stark ab und lag nahe dem Signifikanzniveau. Nach 144 h stieg der HRP-Durchfluss bei den unbehandelten OSE-Kulturen konstant an und bei den stimulierten blieb der Wert niedrig.

Es ist gut vorstellbar, dass sich „tight junctions“ der bovinen OSE-Zellen unter IFN- γ dramatisch verstärken. Deswegen wurde mit der Immunfluoreszenz-Technik das „tight junction“-Molekül Occludin bei den bovinen OSE-Zellen untersucht. Unbehandelte bovine OSE-Zellen zeigten ein punktförmiges, schwaches Muster (Abb. 12A). Nach 72 h Stimulation mit IFN- γ wurde das Muster durchgehend und stärker bei sichtbarer Zunahme des Immunsignals (Abb. 12B). Daraus kann man ableiten, dass OSE-Zellen inkomplette „tight junctions“ bilden. Unter IFN- γ verschließen sich die Kontakte komplett, und die epitheliale Barriere wird verstärkt.

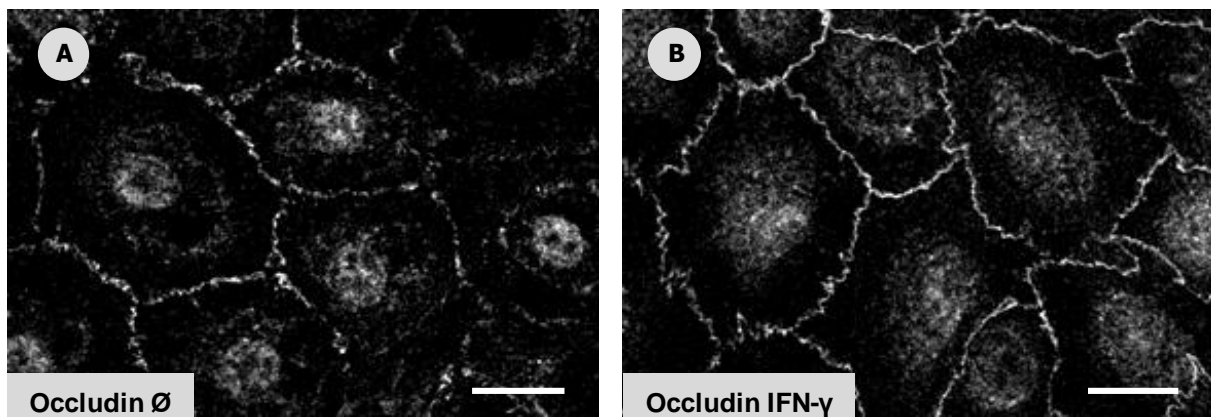


Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung für Occludin-Expression bei bovinen OSE-Zellen

Bovine OSE-Zellen mit Occludin jeweils als unbehandelte Kontrolle (A) und mit IFN- γ behandelt (B). Occludin zeigt bei den bovinen OSE-Zellen ein punktförmiges, schwaches Muster (A). Nach Stimulation mit IFN- γ für drei Tage wird das Muster durchgehend und stärker (B). Maßstab 20 μ m.

4 Diskussion

Die wesentlichen neuen Ergebnisse der vorgelegten Arbeit sind:

1. Die Methodik zur Kultivierung boviner und humaner OSE-Zellen wurde modifiziert.
2. Bovine und humane OSE-Zellen unterscheiden sich in der Expression von E- und N-Cadherin.
3. Bovine und humane OSE-Zellen reagieren unterschiedlich auf IFN- γ .
4. Bovine, mit IFN- γ behandelten OSE-Kulturen sind impermeabel für HRP.

4.1 Anlegen einer Primärzellkultur

Es gibt mehrere Wege, um zu Primärzellkulturen zu kommen. Entweder bezieht man sie von einer Zellkulturbank, oder sie werden vom Experimentator selbst hergestellt. Er kann das Gewebe mechanisch oder enzymatisch in Einzelzellen dissoziieren; größere Gewebe-Organstückchen können mit Scheren und Skalpellern zerkleinert und ggf. mit einem feinmaschigem Sieb Einzelzellen gewonnen werden (Lindl and Gstraunthaler, 2008).

Primärzellkulturen humaner OSE-Zellen werden unterschiedlich etabliert (Auersperg et al., 1994, Kruk et al., 1990, Hirte et al., 1992, Wong et al., 1999). Zugesezte Faktoren fördern das Wachstum mit dem Preis, dass sich die epitheliale Zellmorphologie signifikant verändert (Salamanca et al., 2004, Li et al., 2004). Immortalisierte humane OSE-Zelllinien werden mit dem Ziel etabliert, die Pathogenese des Ovarialkarzinoms zu verstehen und die Therapie zu verbessern. Die Herstellung von Primärzellkulturen ist zeitaufwendig. Doch sie sind wenig verändert und kommen deshalb den physiologischen Bedingungen nahe. Demzufolge sind Primärzellkulturen für Fragestellungen wie Zellmorphologie, Zellmetabolismus und Zellstoffwechsel unverzichtbar.

Primärzellkulturen vom OSE des bovinen und humanen Ovars wurden benötigt. Die Etablierung der Kultur zeigte Probleme, denn das OSE lässt sich schwer vom Bindegewebe mechanisch und enzymatisch trennen. Die differenzierten OSE-Zellen haben ein begrenztes Wachstumspotenzial in Kultur. Mit klassischen Kulturbedingungen und einfacher Methodik wurden zwei bis drei Wochen nach Aussaat subkonfluente Kulturen erhalten. Dies ist ein deutlicher Vorteil gegenüber anderen Methoden der humanen OSE-Zellkultur, die mit Wachstumsfaktoren durchgeführt werden und somit eine eingeschränkte Aussagekraft zu unseren Ergebnissen haben könnten.

Durch Abstreichen der Ovaroberfläche mit einem Wattetupfer wurden Zellen mechanisch abgeschilfert. Größere Zellaggregate sowie winzige Gewebefetzen setzten sich nicht auf dem Kulturboden ab. Die erfolgreiche Kultur von Einzelzellen erfolgte in unserer Methode durch

mehrmaliges Pipettieren. Unter den proteolytischen Enzymen wie Kollagenase, Trypsin, Dispase, Pronase, Elastase sowie verschiedene Kombinationen dieser Enzyme erzielten Trypsin und Pronase die beste Dissoziation von Zellaggregaten/Gewebefetzen. Die Schädigung der Zellen ist dabei stark. Bei dem Andau mit Kollagenase und Dispase werden die Zellen weniger geschädigt, wohingegen die Ausbeute an Einzelzellen schlechter ist. Darum haben wir uns bei der Gewinnung boviner OSE-Zellen für Kollagenase-Dissoziation entschieden. Andere Arbeitsgruppen haben erfolgreich Dispase benutzt. Für die Gewinnung des humanen Materials in situ (während einer Operation) wurden die Abstriche manuell gemacht.

Einige Arbeitsgruppen, die sich mit OSE beschäftigen, berichteten von der Transformation passagierter OSE-Zellen in Fibroblasten-ähnliche Formen. Das heißt, die OSE-Zellen reagieren auf die Explantation in Kultur so, wie sie bei einer Läsion des OSE reagieren würden; sie verändern sich im Phänotyp und vermutlich in der Genexpression, ähnlich den Veränderungen bei regenerativen Reaktionen (Auersperg et al., 2001). Die Transformation zu Fibroblasten-ähnliche Zellen haben wir bei der Kultivierung sowohl der bovinen als auch der humanen OSE-Zellen nicht beobachtet. Die OSE-Zellen behielten das epitheloide Aussehen in weiteren Passagen.

4.2 Vor- und Nachteile bei der Etablierung

Bei der Kultivierung der OSE-Zellen ist der Experimentator mehr gefährdet als beim Umgang mit permanenten Kulturen, denn pathogene Keime können im Ausgangsmaterial sein. Es wurde davon ausgegangen, dass das Material potenziell infektiös ist und deshalb immer mit sterilen Handschuhen gearbeitet.

Eine Primärzellkultur ist nicht unbegrenzt zu kultivieren. Das Gegenteil wurde zu Beginn des letzten Jahrhunderts angenommen. Erst 1961 entdeckte Leonard Hayflick, dass kultivierte Säugetier-Zellen nach ca. 50 Zellteilungen absterben (Hayflick and Moorhead, 1961). Diese eingeschränkte Zellteilungsaktivität führt zur Seneszenz an der Hayflick-Grenze (Hayflick, 1998, Sherr and DePinho, 2000). Für die OSE-Kulturen wurde eine eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit beobachtet. Sie stellten nach einer niedrigen Anzahl von Zellteilungen das Wachstum ein. Kulturen ab der 5. Passage waren in der Regel mit großen, schlecht proliferierenden Zellen seneszent. Für die Versuche wurden Kulturen bis zur 4. Passage als Zeichen einer hohen Qualität genommen. Kriterien waren eine gute Proliferation, Integrität des Monolayers und Reinheit der OSE-Zellen von kontaminierenden Zellen. Glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Granulosazellen sind beim Anlegen von OSE-Kulturen problematisch. Bei den humanen Proben änderte sich die Abstrichtechnik von Operateur zu

Operateur, was die Reinheit der humanen OSE-Kulturen beeinflusste. Eine mechanische Isolierung der OSE-Zellen aus der Mischkultur war anzustreben, damit Fibroblasten sowie gut proliferierende Granulosazellen die langsam wachsenden OSE-Inseln nicht überwuchern (Abb. 13). Die Ovarien, von denen die humanen OSE-Zellkulturen stammten, haben individuelle Unterschiede wie Alter und Gene der Patientinnen. Erhebliche Unterschiede hinsichtlich Morphologie und Alter der Zellen, erschwerten die Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse. Die Abhängigkeit vom Operationsplan der Klinik führte zu Mangel an Material, welches die Kultivierung von OSE erschwert hat. Im Gegensatz dazu sind bovine Ovarien gut für das Anlegen von OSE-Zellkulturen zugänglich und erlauben Studien, die bisher wegen Mangel an normalem Gewebe entfielen. Die bovine OSE-Zellkultur war homogen; die Zellen waren morphologisch gleich. Kontaminierende Zellen zeigten sich im Vergleich zur humanen OSE-Kultur selten, wie mit der Immunfluoreszenz für Cytokeratin leicht zu überprüfen war. Die Homogenität der positiven Zellantwort zeigte, dass die Etablierung der Primärzellkultur von OSE-Zellen erfolgreich durchgeführt wurde. Damit war das erste Ziel erreicht.

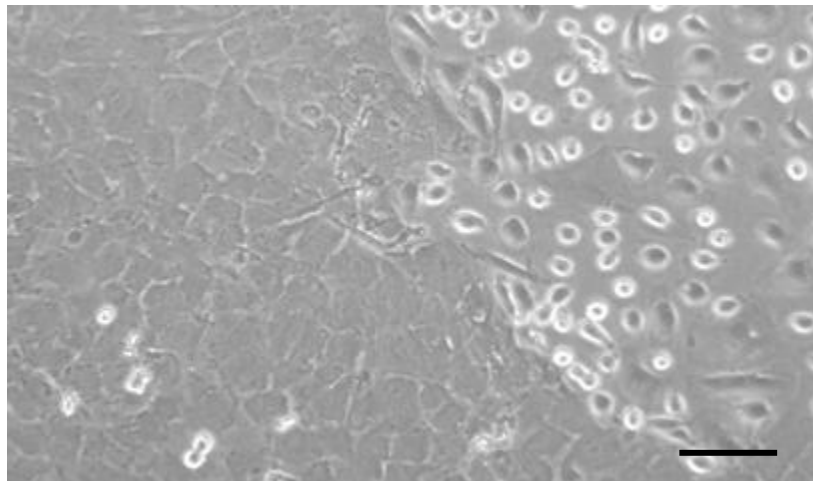


Abb. 13: Die Mischkultur zeigt links Granulosazellen und rechts epithelioide OSE-Zellen.
Maßstab 100 µm.

4.2 Morphologische Unterschiede zwischen bovinen und humanen OSE-Zellkulturen

4.2.1 Kulturen ohne IFN- γ

Kontrollen boviner und humaner OSE-Zellen zeigten im Phasenkontrastmikroskop das kompakte, pflastersteinartige Bild eines epithelialen Monolayers. Diese Morphologie ist für OSE-Zellen typisch und entspricht der Literatur (Auersperg et al., 2001).

Bovine und humane OSE-Zellen zeigten bei der Immunfluoreszenz sowie der Western Blot Analyse für Cytokeratin und Vimentin ein positives Signal. Dies bestätigt den epithelial-mesenchymalen Charakter der OSE-Zellen, welcher bekannt ist (Auersperg et al., 2001). Bovine und humane OSE-Zellen unterscheiden sich in der Expression von E- und N-Cadherin deutlich. Bei den bovinen OSE-Zellen konnte in der Immunfluoreszenz sowie der Western Blot Analyse eine E-Cadherin-Expression nachgewiesen werden. Eine N-Cadherin-Expression ließ sich bei unbehandelten, bovinen OSE-Zellen mit den eingesetzten Methoden nicht zeigen. An fehlender Spezifität des Antikörpers kann es nicht liegen, denn bovine Granulosazellen dienten als Positivkontrolle. Auch bei Maus und Schwein findet sich nur E-Cadherin im OSE (MacCalman et al., 1994, Ryan et al., 1996).

Bovine OSE-Zellen und humane OSE-Zellen zeigten ein schwaches Signal bei β -Catenin. Im Gegensatz zu den bovinen OSE-Zellen zeigten humane OSE-Zellen bei der Immunfluoreszenz-Technik sowie der Western Blot Analyse eine positive Antwort für E- und N-Cadherin. Diese Ergebnisse konnten am intakten OSE des menschlichen Ovars bestätigt werden. Das E-Cadherin-Immunsignal der humanen OSE-Zellen zeigte in der Immunfluoreszenz ein besonderes Muster dort, wo drei bis vier Zellen in Kontakt traten (Zell-zu-Zell-Ecken). Der Drüsenazinus-ähnliche Komplex, der nur bei humanen, stimulierten OSE-Zellen beobachtet wurde, war bei der Immunfluoreszenzfärbung für E- und N-Cadherin, aber auch β -Catenin zu sehen. Die interessante Beobachtung könnte der Versuch einer in vitro Invagination sein.

4.2.2 Kulturen mit IFN- γ

Das Hauptziel war, die Wirkung von IFN- γ auf die Morphologie und Zell-Zell-Kontakte von OSE-Zellen zu untersuchen. Bovine und humane OSE-Kulturen wurden deswegen mit 200 U/ml rekombinantem, speziesspezifischem IFN- γ stimuliert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosisstärke von 200 U/ml IFN- γ und die Stimulationsdauer von 72 h wurden bereits in vorangegangenen Arbeiten etabliert (Fenyves et al., 1993, Ricken et al., 1996). Es wurde mit 200 U/0,5 ml gearbeitet.

Nach Stimulation mit IFN- γ veränderte sich die Morphologie der bovinen und humanen OSE-Zellen. Die Zellen flachten ab, und das pflastersteinartige Bild war weniger ausgeprägt. Vergleich man bovine mit humanen Zellen, schien der IFN- γ bedingte Effekt der Abflachung bei den bovinen Kulturen stärker zu sein.

IFN- γ beeinflusste kaum die Vimentin-Expression. Doch verstärkten sich Cytokeratin-Filamente bei den bovinen OSE-Zellen in der Immunfluoreszenz unter der Stimulation und bildeten eindrucksvolle periphere Bündel wie bei Desmosomen. Eine vergleichbare Beobachtung liegt für behandelte CK⁺-Zellen, die aus dem bovinen Corpus luteum isoliert waren (Ricken et al., 1996).

Die E-Cadherin-Expression boviner OSE-Zellen hat sich unter Stimulation verstärkt. Eine N-Cadherin-Expression ließ sich bei behandelten, bovinen OSE-Zellen nicht zeigen. Das β -Catenin Signal bei den bovinen OSE-Zellen wurde nach der Stimulation gebildet. Bei den humanen OSE-Zellen wurde es stärker. Nach Stimulation mit IFN- γ wurde das Signal von E-Cadherin humaner OSE-Zellen an den Zell-zu-Zell-Ecken intensiver. Das N-Cadherin-Immunsignal zeigte nach der Stimulation ebenso dieses Muster und konzentrierte sich auch an den Zell-zu-Zell-Ecken. Zu betonen ist, dass die E-Cadherin- und N-Cadherin-Expression humaner OSE-Zellen auf Proteinebene nach der Stimulation unverändert war. Daraus lässt sich schließen, dass bovine und humane OSE-Zellen unterschiedlich unter IFN- γ Stimulation reagieren.

Es wird kontrovers diskutiert, ob oder ob nicht humanes E-Cadherin von OSE exprimiert wird. Zunächst wurde berichtet, dass humanes OSE kein E-Cadherin bildet (Shimoyama et al., 1989), weder in vivo noch in vitro (Auersperg et al., 1995). N-Cadherin konnte die Funktion der Zell-Zell-Kontakte für die epitheliale Integrität humaner OSE-Zellen übernehmen (Hudson et al., 2008). Eine hohe E-Cadherin-Expression wurde in Inklusionszysten des OSE beobachtet (Maines-Bandiera and Auersperg, 1997). Normales OSE von Frauen mit familiärer Belastung an Ovarialkarzinom besitzt eine starke E-Cadherin-, aber auch N-Cadherin Expression (Wong et al., 1999). Das Auftreten von E-Cadherin im normalen OSE deutet auf ein hohes Risiko hin am Ovarialkarzinom zu erkranken. Ob die beobachtete Expression von E-Cadherin in humanen OSE-Zellen einen prädisponierenden Wert hat, ist unklar. Die E-Cadherin-Expression konnte keine Folge der Kultur sein, denn im intakten Ovar war sowohl E- als auch N-Cadherin nachzuweisen werden. Interessanterweise zeigten Davies et al. (1998) eine punktuelle E-Cadherin-Anfärbung im OSE und in Inklusionszysten bei 4 von 6 gesunden Ovarien.

4.2.3 Anmerkungen zur immunologischen Antigenlokalisation

Zellkulturen und Gewebeschnitte boviner und humaner Ovarien wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Technik und Immunhistologie untersucht, um spezifische Zellkontaktproteine zu finden. Die Qualität immunhistochemischer Färbungen ist von der Fixierung, dem Antikörper und von möglichen Konformationsänderungen der Epitope (Antigen-Maskierung) als Folge der Formalinfixierung abhängig. Daher wurden Epitope durch Erhitzen in der Mikrowelle bei 95°C mit Tris EDTA-Lösung demaskiert. Manche Paraffinschnitte wurden durch die hohe Temperatur geschädigt. Sie hafteten schlecht am Objektträger und konnten abschwimmen. Die Qualität der Färbungen zeichnete sich aus durch eine hohe Sensitivität, ein Fehlen von Hintergrundfärbung und eine intensiv positive sowie reproduzierbare Färbereaktion. Letzteres war nicht einfach zu erzielen, da die histochemische Reaktion für gebundene Peroxidase mit dem Chromogen DAB schnell und unregelmäßig eintrat. Durch weitere Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers wurde die Entwicklung der Farbe langsamer und somit gleichmäßig. Bei den immunhistochemischen Färbungen handelt es sich um individuelle Experimente, wobei sich für verschiedene Schnitte Unterschiede in der Färbungsintensität ergaben. Die Immunfluoreszenzfärbungen zeigten kaum Probleme. Die Schwierigkeit lag darin, ein spezifisches- von einem unspezifischen Signal zu unterscheiden, insbesondere bei punktueller Färbung des Zytoplasmas. Diese Differenzierung konnte mit Hilfe der Negativkontrolle erreicht werden, welche nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde. Die positive Antwort einer Zelle auf eine immunologische Färbung ist einer objektiven Beurteilung zugänglich. Sie gibt jedoch keine quantitative Aussage. Das positive Signal bedarf des Nachweises auf der biochemischen Ebene mit der Western Blot Analyse. Diese Methode stellt eine qualitative, bzw. semi-quantitative Nachweismethode dar und dient der Analyse von Zell-Lysaten. Eindeutige Banden konnten wir durch unterschiedliche Verdünnungen des Primär- und Sekundärantikörpers erhalten. Probleme zeigten sich bei dem Hauskeeping-Gen β -Aktin, welches bevorzugt bei IFN- γ stimulierten OSE-Lysaten (bovin, human) eine Doppelbande ergab. Beim längeren Belichten vereinigte sich die schwächere Bande mit der starken zu einer Antwort. Diese Hauptbande trat bevorzugt bei den unstimulierten OSE-Lysaten auf. Wir untersuchten deswegen OSE-Lysate mit einer anderen Extraktionsmethode auf β -Aktin. Die bovinen OSE-Lysate ergaben erneut eine Doppelbande, und die humanen OSE-Lysaten hingegen nur eine. Bei der zweiten Bande handelt sich wahrscheinlich um ein Degradationsprodukt.

4.3 Keine Permeabilität für HRP bei IFN- γ behandelten, bovinen OSE-Kulturen

Unterschiede in den Zellkontaktproteinen bestätigten sich mit den Permeabilitätsuntersuchungen von bovinen und humanen OSE-Zellen. Das Enzym HRP diffundierte beim bovinen und humanen Monolayer durch die engen Interzellularspalten in das untere Kompartiment, wenn die OSE-Zellen unvollständige „tight junctions“ entwickeln. Dieses war der Fall bei humanen OSE-Zellen unter IFN- γ Behandlung. Hingegen zeigten bovine OSE-Zellen, nach drei tägiger IFN- γ Stimulation, eine Reduktion um mehr als 90%. Dies bestätigte sich nach 12 aber auch nach 60 h Stimulation. Der Effekt von IFN- γ blieb für weitere 72 h nach Rücknahme des Mediators bestehen. Damit bekommt die morphologische Beobachtung der verstärkten Interzellularkontakte bei bovinen IFN- γ behandelten OSE-Zellen eine funktionelle Bestätigung. Anzumerken ist, dass die HRP-Permeabilität bei CK⁺-Zellen (aus dem bovinen Gelbkörper) nach Stimulation mit IFN- γ ebenso stark abnahm (Ricken et al., 1996).

„Tight junctions“ haben sehr unterschiedliche Funktionen bei der Barrierebildung. Viele dichten ab und verhindern den Durchfluss löslicher Substanzen durch die parazellulären Poren der Epithelzellen (Tsukita et al., 2001, Anderson et al., 2004, Schneeberger and Lynch, 2004). Andere bewirken das Gegenteil, indem sie parazellulär verlaufende Kanäle bilden (Claudin-2, -7, -16). „Tight junctions“ unterteilen die Epithelzellen in apikale und basale Bereiche. Während einer EMT gehen „tight junctions“ komplett verloren, womit epitheliale Zellen ihre Polarität verlieren (Hay, 1995). Da bei einer EMT eine „downregulation“ von E-Cadherin stattfindet, konnte der Verlust von „tight junctions“ damit korrelieren und die Reduktion von Tricellulin und/oder Occludin bedingen. Der Effekt von IFN- γ auf die „tight junctions“ bedarf der Nachforschung. Mittels des Freeze Fracture Verfahrens konnte man die Anordnung, Ausdehnung und Kontinuität der „tight junction“-Stränge sowie deren Veränderungen unter Stimulation mit IFN- γ untersuchen.

Das Ko-Kultursystem zur Beurteilung der OSE-Barriere

Bei der Permeabilitätsmessung gehörte die Epithelschicht auf der permeablen Membran zum oberen Kompartiment, während die diffundierten Moleküle in das untere Kompartiment gelangen. Dieses Zellkultursystem entspricht einem zwei-Kompartiment-System. Die Filtereinsätze des oberen/apikalen Kompartiments hängen in den Vertiefungen des unteren Kompartiments. Das System ist für Ko-Kulturen geeignet, weil der Zellrasen im unteren Kompartiment durch den Filtereinsatz im oberen Kompartiment nicht beschädigt wird. Die Filtereinsätze haben eine mikroporöse Membran die optisch transparent und abhängig von der

Porengröße für Moleküle mit nieder- und hochmolekulare Größe durchlässig ist. Die Filtermembranen sind mit verschiedenen Materialien wie z.B. Polycarbonat, Nitrocellulose, Polyester, Aluminiumoxid Keramikfilter ausgestattet.

Die physiko-chemischen Eigenschaften der Membran sind für das erfolgreiche Kultivieren bedeutsam. Die Proteinbindung bestimmt das feste Anhaften und Auswachsen der Zellen ebenso wie die Beschichtung mit Komponenten der extrazellulären Matrix. Die Wahl der Membran kann zu unspezifischen Bindungen bei Transportstudien führen und Ergebnisse entscheidend beeinflussen (Lindl and Gstraunthaler, 2008).

Das Ko-Kultursystem soll die biologische Barriere des Epithels nachahmen, indem sie die Permeabilität von HRP ermöglicht. OSE-Zellen entwickelten sich auf der Membran zu einer einlagigen, zusammenhängenden Zellschicht. Der Monolayer ist durch Kontaktinhibition gekennzeichnet. Die Ausbildung einer epithelialen Barriere kann eingeschätzt werden, indem HRP in das obere Kompartiment kommt. Die Permeation der hydrophilen Substanz geht über die Poren der Membran. Die Menge an HRP-Aktivität in dem unteren Kompartiment erlaubt zu beurteilen, ob Zell-Zell-Kontakte dicht sind und als Barriere geeignet sind.

4.4 Mögliche Interaktionen der „tight junctions“ und klinische Bedeutung

Das E-Cadherin-Immunsignal der humanen OSE-Zellen in der Immunfluoreszenz konzentrierte sich dort, wo drei bis vier Zellen in Kontakt traten (Zell-zu-Zell-Ecken). Die lateralen Zell-zu-Zell-Kontaktseiten zeigten nur ein schwächeres, punktuell Signal, welches nach Stimulation mit IFN- γ verstärkt wurde. Das N-Cadherin zeigte nach Stimulation ebenfalls dieses Muster und konzentrierte sich an den Zell-zu-Zell-Ecken. Dieses Cadherinmuster ist in der Literatur unbekannt. In der Vergangenheit zeigte Menco, dass „tight junction“-Stränge erst in Regionen auftreten wo drei Zellen in Kontakt treten (Menco, 1988). Interessanterweise wurde Ende 2005 ein „tight junction“-Protein erstmals beschrieben, welches bevorzugt in der trizellulären „tight junctions“ vorkommt und deswegen Tricellulin genannt wurde (Ikenouchi et al., 2005). Das Fehlen von Tricellulin führt zu einer Störung der epithelialen Barriere. Es besteht eine partielle Sequenzhomologie mit Occludin. Verlust von Occludin führt zu einer Dislokalisierung von Tricellulin und impliziert damit, dass Occludin die trizelluläre Lokalisation von Tricellulin unterstützt (Ikenouchi et al., 2005). Krug et al. (2009) belegten, dass Tricellulin eine Abdichtung der trizellulären Junction gegenüber Makromolekülen bewirkt, ohne dabei die Ionenleitfähigkeit des Gesamtepithels merklich zu beeinflussen.

In vitro Studien haben gezeigt, dass E-Cadherin nicht nur für die Bildung der „adherens junctions“ erforderlich ist. Die adhäsive Aktivität von E-Cadherin ist auch für andere

junktionale Komplexe entscheidend, wie Desmosomen, „gap junctions“ and „tight junctions“ (Gumbiner et al., 1988, Musil et al., 1990, Watabe et al., 1994). Dieser junktionale Komplex begründet die Zellpolarität und die Anreicherung der Zellkontakte (Nelson, 2003). Interessanterweise wurde eine erhöhte Permeabilität der „tight junctions“ bei einer Abwesenheit von E-Cadherin gezeigt. E-Cadherin ist speziell für die „tight junction“-Bildung erforderlich und könnte diese beeinflussen (Tunggal et al., 2005).

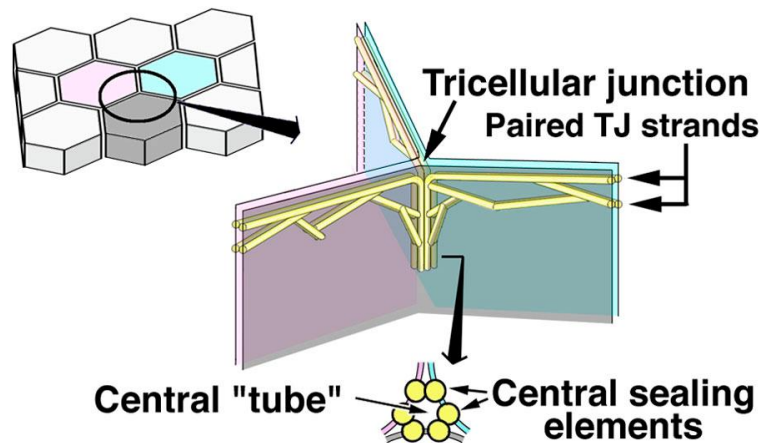


Abb. 14: Schematische Zeichnung der trizellulären „tight junction“.

Ein trizellulärer Kontakt (links) ist rechts vergrößert nach Ikenouchi et al., 2005. „Tight junctions“ wie z.B. Occludin bestehen aus einem Netzwerk schmaler Stränge (gelb), die den gesamten Zellumfang gürtelartig umgeben. An den Ecken der trizellulären Kontakte sind jeweils zwei vertikalen Stränge lokalisiert, die seitlich eng assoziiert sind. Das resultierende Zentralrohr könnte ein Schwachpunkt für die epitheliale Barriere sein. Hier lokalisiert sich Tricellulin.

4.5 Das bovine OSE als Modell der Kanzerogenese

Bei der Kuh sind verschiedene Malignome des Ovars beschrieben (Anderson and Sandison, 1969, Yener et al., 2004). Daher verspricht bovines OSE ein vergleichbares onkogenes Potential wie humanes OSE.

Die Häufigkeit der Ovarialtumoren bei Tieren ist mit der bei der Frau nicht zu vergleichen, da Kühe geschlachtet werden, bevor sie älter werden. Dies gilt insbesondere für Schafe und Schweine, während der Rinderbestand ein beträchtlicher Anteil der weiblich adulter Tiere hat. Die erhobenen klinischen Diagnosen vom Schlachthof sollten die Inzidenz von Ovarialtumoren bei Kühen möglichst genau darstellen. Neoplasien in bovinen Ovarien, die in 100 Schlachthöfen während eines Jahres geschlachtet wurden, unterteilten sich in Fibrome, Granulosazelltumore, seröse Zystadenokarzinome, muzinöse Zystadenokarzinome und Adenoakanthome. Zystadenokarzinome waren die häufigsten und traten über eine weite Altersspanne von 1 ½ bis 21 Jahren auf (Anderson and Sandison, 1969). Andere berichten von Granulosazelltumoren als die häufigsten bovinen Ovarmalignomen (MacEntee, 1990). Das

seröse papilläre Zystadenom könnte vom Rete ovarii abstammen und nicht aus dem OSE (Yener et al., 2004).

Das bovine Ovar scheint kein dienliches Modell für das Studium der Kanzerogenese zu sein, weil deutliche Unterschiede der Zellkontaktproteine in OSE-Kulturen auftreten, verglichen mit humanen OSE-Kulturen.

4.6 IFN- γ und seine Wirkung im Ovar

Mit IFN- γ wurde ein Zytokin mit unterschiedlichen Aufgaben in der angeborenen und adaptiven Immunantwort entdeckt (Miller et al., 2009). Da IFN- γ in unterschiedlich entwickelten Spezies vorkommt, ist es in der Evolution konserviert worden. T-Zellen und „natural killer“-Zellen sind die primären Produzenten von IFN- γ . Es hat Auswirkungen auf die produzierenden Zellen und auf die Immunregulation, einschließlich antiviraler, antimikrobieller und antineoplastischer Aktivität (Miller et al., 2009). Durch IFN- γ werden Makrophagen aktiviert, die zur Lysis von Tumorzellen führen (Mannel and Falk, 1983).

IFN- γ gilt als potenter Inhibitor der Zellproliferation von Ovarialkarzinom-Zelllinien. Deswegen wurde IFN- γ in die additive Therapie des refraktären Ovarialkarzinoms eingeführt (Pujade-Lauraine et al., 1996, Marth et al., 1996, Wall et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für den antiproliferativen Effekt, könnte die Fähigkeit von IFN- γ sein, Gene der Apoptose und Proliferation zu regeln. IFN- γ reduziert die Expression des Protooncogens c-erbB-2 (HER-2/neu) in humanen Ovarialkarzinomzellen (Marth et al., 1990). Weil nur 10% der Ovarialtumoren HER-2 überexprimieren, spielt dieser IFN- γ -vermittelte Effekt möglicherweise keine wichtige Rolle. IFN- γ sowie andere Zytokine haben Auswirkungen auf epitheloide Monolayer wie humane Endothelzellen (Montesano et al., 1984, Sato et al., 1986, Stolpen et al., 1986, Friesel et al., 1987). Sie wurden spindelförmig, verloren färbbares Fibronectin, und die Aktinfilamente ordneten sich. Obwohl die Zellen die Kontaktinhibition verloren, blieb das Wachstum gehemmt. Die Veränderungen entwickelten sich über 72-96 h und waren reversibel beim Absetzen von IFN- γ . Interessanterweise verstärkte eine Stimulation mit IFN- γ über drei Tage bei CK⁺-Zellen, isoliert aus dem bovinen Corpus luteum die Interzellularkontakte; die HRP-Permeabilität sank (Ricken et al., 1996). Eine deutliche Zunahme der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte fiel auf (Fenyves et al., 1993). Vergleichbares kann für die IFN- γ behandelten, bovinen OSE-Kulturen bestätigt werden. Dieser Befund hat Neuigkeitswert und erklärt warum IFN- γ bei der Regulation des OSE-Zellwachstum unwirksam ist (Marth et al., 1996).

4.7 Ovarialkarzinom und OSE

Unter dem Begriff Ovarialmalignom wird eine heterogene Gruppe unterschiedlicher Tumore subsummiert, welche aufgrund des histogenetisch vielfältig differenzierten Ovaraufbaus ein breites Spektrum morphologisch und biologisch unterschiedlicher Tumortypen zeigt. Die Klassifikation der WHO von Serov und Scully (1997) teilt die Ovarialtumore in drei Hauptgruppen ein: epitheliale Tumore, Keimstrang-Stroma-Tumore und Keimzelltumore. Dabei sind mit 70 bis 90% die epithelialen Ovarialtumore (Ovarialkarzinome) die bedeutsamste Gruppe unter den Malignomen und auch die mit der schlechtesten Prognose. Das Ovarialkarzinom stellt die häufigste tumorbedingte Todesursache bei der Frau dar, mit einem Anteil von 5,4% aller bösartiger Neuerkrankungen (Landis et al., 1999, Pecorelli et al., 2002).

Normalerweise gehören Störungen der histotypischen Organisation zu den frühesten phänotypischen Veränderungen bei der Krebsentstehung. Bei den meisten Epithelien kommt es demzufolge zu einem fortschreitenden Verlust komplexer, gewebespezifischer Strukturen und Funktionen. Das Ovarialkarzinom unterscheidet sich von diesem allgemeinen Verhaltensmuster. Histopathologisch sind Ovarialkarzinome von allen menschlichen Malignomen die komplexesten (Young et al., 1989, Van Niekerk et al., 1993). Eines der ungewöhnlichsten Aspekte der ovariellen Karzinogenese ist der Wechsel der Differenziertheit. Wie oben erwähnt, ist das OSE ein einfaches Epithel mit stromalen Funktionen. Wenn das OSE entartet, erlangt es die Kennzeichen des Müller-Gangepithels, aus dem Eileiter, Endometrium und Zervix entsteht. Die abnormale Differenzierung des OSE führt zum Ovarialkarzinom unter dem Bild des Adenokarzinomes. Sie werden in seröse (eileiterähnlich), endometriale (endometriumähnlich) und muzinöse (endozervikalähnlich) Adenokarzinome unterteilt. Nur in fortgeschrittenen Stadien verliert sich das epitheliale Bild (Maines-Bandiera and Auersperg, 1997).

Das Ovarialkarzinom beruht auf einer autonomen Proliferation des OSE. Es entwickelt sich aus einer OSE-Papille oder sehr viel häufiger als ein zystischer Tumor, vermutlich auf dem Boden einfacher Inklusionszysten. Den "ständigen Ovulationen" wird für die Entstehung des Ovarialkarzinoms Bedeutung zugemessen (Cramer et al., 1982, Cramer and Welch, 1983). Der zweite Schritt ist die direkte oder indirekte Stimulierung des eingeschlossenen Epithels durch Gonadotropine und Östrogene (Casagrande et al., 1979, Fathalla, 1971). Ein neues Konzept über die Entstehung von Ovarialkarzinomen beweist, dass die Vorläuferstadien in der Tubenschleimhaut (Fimbrien) entstehen, die dann bei einer Ovulationsbedingten Läsion der Ovaroberfläche in das OSE eindringen können (Kurman and Shih, 2010). Insgesamt sind

die pathogenetischen Mechanismen der Genese von Ovarialkarzinomen trotz zahlreicher Untersuchungen bislang nur ansatzweise verstanden.

4.8 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit deckt eine neue Wirkung von IFN- γ auf. Es hat die besondere Eigenschaft, das OSE komplett abzudichten. IFN- γ verstärkt die Zell-Zell-Kontakte der OSE-Zellen und führt zu keiner mesenchymalen Transformation. Die Zell-Zell-Kontakte werden somit stabilisiert und nicht gelockert.

Die Beobachtung, dass IFN- γ die Zell-Zell-Kontakte der bovinen OSE-Zellen verstärken, könnte den klinischen Einsatz des Zytokins bei der adjuvanten Therapie des Ovarialkarzinoms erklären. Man kann postulieren, dass verstärkte Interzellularkontakte die Frühinvasion maligner Zellen einschränken.

Die eingeschränkte Antwort der humanen OSE-Zellen auf IFN- γ die Interzellularkontakte zu stärken, konnte nicht einer Abwesenheit von IFN- γ -Rezeptoren zugerechnet werden. Andere haben die Zunahme der Major Histocompatibility Complex der Klasse I und II unter IFN- γ Behandlung von OSE-Zellen beschrieben (Marth et al., 1996). Eine Zunahme von E-Cadherin wurde hier gefunden. Für eine vollständige Wirkung von IFN- γ auf die humanen OSE-Zellen ist eine Kooperation mit einem anderen Zytokin wie z.B. TNF oder sogar Platinkomplexverbindungen denkbar. Eine Kombination von IFN- γ und TNF zeigte eine Verstärkung der anti-proliferativen Aktivität in Ovarialkarzinomzellen gegenüber alleiniger IFN- γ Behandlung (Marth et al., 1996). Die standardisierte Therapie des Ovarialkarzinoms war die Platin-basierte Chemotherapie. Eine Wirkungssteigerung der Therapie wäre durch Kombination von IFN- γ mit Platin-Chemotherapeutika möglich, wie in vitro gezeigt wurde (Marth et al., 2006).

Die Unterschiede in der E-Cadherin- und N-Cadherin-Expression sind vermutlich speziesabhängig exprimiert und nicht altersbedingt. In der Literatur wurde vorgeschlagen, dass die Kombination von E- und N-Cadherin die epitheliale Differenzierung von Zellen den mesodermalen Ursprung charakterisiert (Shimazui et al., 1996). Die gefundenen Ergebnisse sollten an Tumorzellen von Patientinnen mit Ovarialkarzinom überprüft werden. E-Cadherin scheint mit „tight junctions“ der Zellecken zu interagieren. Dafür sind Koloalisationen in der Immunfluoreszenz notwendig.

4.9 Ausblick

Das Ovarialkarzinom hat eine sehr hohe Letalität und ist in 50% der Fälle, bezogen auf alle Tumore des Genitaltraktes, zum Tod. Folglich bedürfen die Mechanismen von Wachstum und Differenzierung des OSE als potentiell neoplastisches Herkunftsepithel dringlicher Erklärung. Hieraus könnte man die Empfindlichkeit der Tumore auf Hormone und Zytokine ableiten und möglicherweise therapeutisch ausnutzen. Obwohl Tumormarker für die heterogenen Ovarialtumoren identifiziert sind, ist bisher ein adäquater Marker nicht gesichert. Bemühungen, solche Screening-Verfahren zu entwickeln, sind durch mangelndes Verständnis dieser Tumorphogenese limitiert. Proteinexpressionsprofile von normalen humanen OSE-Zellen und Zellen von Ovarialkarzinomen könnten genutzt werden, um Proteine als biologische Marker der Zelltransformation zu identifizieren. Verbesserte Strategien zur Früherkennung des Ovarialkarzinoms können verbessert werden und die therapeutische Maßnahme erweitert. Probleme, die bei der Kultivierung humaner OSE-Zellen bestehen, sind die kurze Lebensdauer und geringe Zahl der intraoperativ gewonnenen Zellen. Die Lebensdauer der OSE-Zellen lässt sich durch Einpflanzung immortalisierende Gene wie die HPV Gene P6 und P7 (Tsao et al., 1995, Wan et al., 1997) sowie das SV40-T-Antigen (Tag) verlängern (Maines-Bandiera et al., 1992). Solche immortalisierte OSE-Zelllinien sind ein klinisch relevantes Modell, um die molekulare Ätiologie Ovarialkarzinomen im frühen neoplastischen Stadien zu erforschen. Dieser Weg ist ebenso für das Fimbrienepithel sinnvoll, das ebenso als Muttergewebe des Ovarialkarzinoms diskutiert wird.

5. Zusammenfassung

Das Oberflächenepithel (OSE) des Ovars besteht aus einer Schicht flacher oder kubischen Zellen, die am Hilus in das flache Peritonealepithel übergehen. Das OSE zeigt zyklusabhängige Veränderungen. OSE-Zellen sollen am Prozess der Ovulation aktiv teilnehmen. Sie sollen beitragen, die Tunica albuginea und die Follikelwand zu degradieren und somit das Gewebe an der späteren Rupturstelle schwächen. Die entstandene Läsion auf der Ovaroberfläche wird durch proliferierende OSE-Zellen der Nachbarschaft zügig repariert. Die mitotische Aktivität der OSE-Zellen um den Reparatur-Prozess könnte das Überleben von mutierten Zellen begünstigen und zum Ovarialkarzinom führen. Studien über das OSE sind durch den Mangel an effizienten Modellen eingeschränkt. Bovine Ovarien stellen ein dienliches Modell für normale OSE Biologie dar. Das bovine Ovar hat im Wesentlichen dieselbe Größe und Physiologie wie das humane Ovar.

Zell-Zell-Kontakte spielen eine Schlüsselrolle bei der Integrität von Gewebe und der Metastasierung von Tumoren wie zum Beispiel des Ovarialkarzinoms. Um das Verständnis über die Pathogenese des Ovarialkarzinoms zu verbessern, wurden in der vorliegenden Arbeit die Zell-Zell-Kontakte des OSE untersucht. Die Aufgabe war herauszufinden, inwieweit sich bovine und humane OSE-Zellen bei der Expression von E- und N-Cadherin sowie β -Catenin unterscheiden und welchen Einfluss Interferon- γ (IFN- γ) hat. Viele klinische Arbeiten haben den adjuvanten therapeutischen Effekt von IFN- γ beim Ovarialkarzinom beschrieben. Die Charakterisierung humaner und boviner OSE-Zellen in Kultur sollte Hinweise über Funktion und evtl. karzinogene Rolle geben.

Die Methodik zur Kultivierung boviner und humaner OSE-Zellen wurde modifiziert. Humane Ovarien von Patientinnen der Frauenklinik der Universität Leipzig sowie bovine Ovarien aus dem Schlachthof Altenburg/Thüringen dienten als Quelle zur Kultivierung von OSE-Zellen. Durch Abstreichen der Ovaroberfläche mit einem Wattetupfer wurden Zellen mechanisch abgeschilfert. Konfluente Kulturen wurden mit 200 U/ml rekombinantem, speziesspezifischem IFN- γ für 72 h behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Mit Phasenkontrastaufnahmen wurde die Morphologie der OSE-Zellen vor und nach der Behandlung dargestellt. Mittels immunzytologischer Färbungen sowie Western Blot Analyse wurden E- und N-Cadherin, β -Catenin, Cytokeratin sowie Vimentin nachgewiesen. E- und N-Cadherin wurden zusätzlich mittels immunhistologischer Färbungen am intakten OSE boviner und humaner Ovarien nachgewiesen. Permeabilitätsmessungen von Meerrettichperoxidase (HRP) in einem Ko-Kultursystem wurden mit und ohne IFN- γ durchgeführt. Die Menge an HRP-Aktivität in dem unteren Kompartiment erlaubte zu beurteilen, ob die Zell-Zell-

Kontakte dicht sind und als Barriere geeignet. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen für Occludin sollten „tight junctions“ bestätigt werden.

Kontrollen boviner und humaner OSE-Zellen zeigten das kompakte, pflastersteinartige Bild eines epithelialen Monolayers. Nach der IFN- γ Behandlung flachten die Zellen ab und das pflastersteinartige Bild war weniger ausgeprägt. Vergleich man die bovine mit humanen Zellen, schien der Effekt von IFN- γ bei den bovinen stärker zu sein. Beide OSE-Typen zeigten für Cytokeratin und Vimentin eine positive Reaktion, welches den epithelial-mesenchymalen Charakter der OSE-Zellen bestätigte. Nach der Stimulation mit IFN- γ verstärkten sich die Cytokeratin-Filamente bei den bovinen OSE-Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung und bildeten eindrucksvolle periphere Bündel. Eine E-Cadherin-Expression wurde sowohl bei bovinen als auch humanen OSE-Zellen nachgewiesen, welche bei den bovinen OSE-Zellen nach der Stimulation mit IFN- γ deutlich stärker war. Bei den humanen stimulierten OSE-Zellen war das E-Cadherin-Signal an den Zell-zu-Zell-Ecken intensiviert. Eine N-Cadherin-Expression fehlte bei den bovinen OSE-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten humane OSE-Zellen für N-Cadherin eine positive Antwort. Diese unterschiedliche Cadherin-Expression konnte am OSE des intakten Ovars bestätigt werden. Bei beiden OSE-Typen konnte β -Catenin nachgewiesen werden, welches nach Stimulation mit IFN- γ verstärkt wurde. Wieder war der Effekt von IFN- γ bei den bovinen Kulturen stärker als bei den humanen. Mit IFN- γ behandelte bovine OSE-Kulturen waren impermeabel für HRP. Das nach Stimulation morphologisch verstärkte Occludin-Signal bestätigte, dass komplett abdichtende „tight junctions“ dafür verantwortlich waren. Bei humanen OSE-Kulturen wurden keine signifikanten Unterschiede der HRP-Permeabilität mit und ohne IFN- γ beobachtet.

Die Arbeit zeigt eine neue Wirkung von IFN- γ . Es hat die besondere Eigenschaft, das OSE komplett über Cadherin-vermittelte „tight junctions“ abzudichten. Dies könnte den klinischen Einsatz des Zytokins bei der adjuvanten Therapie des Ovarialkarzinoms erklären. Möglicherweise werden Interzellularkontakte verstärkt und die Frühinvasion maligner Zellen eingeschränkt. Das erstmals beschriebene Cadherinmuster an den Zell-zu-Zell-Ecken verweist auf die Interaktion der „tight junctions“ mit E-Cadherin.

Literaturverzeichnis

- Ackerman RC, Murdoch WJ (1993) Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins*, **45**, 475-85.
- Adams AT, Auersperg N (1981) Transformation of cultured rat ovarian surface epithelial cells by Kirsten murine sarcoma virus. *Cancer Res*, **41**, 2063-72.
- Anderson JM, Van Itallie CM, Fanning AS (2004) Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 140-5.
- Anderson LJ, Sandison AT (1969) Tumours of the female genitalia in cattle, sheep and pigs found in a British abattoir survey. *J Comp Pathol*, **79**, 53-63.
- Auersperg N, Maclaren IA, Kruk PA (1991) Ovarian surface epithelium: autonomous production of connective tissue-type extracellular matrix. *Biol Reprod*, **44**, 717-24.
- Auersperg N, Maines-Bandiera S (2000) Culture and characterization of human ovarian surface epithelium. *Ovarian Cancer: Methods and Protocols*, 169-173.
- Auersperg N, Maines-Bandiera S, Booth JH, Lynch HT, Godwin AK, Hamilton TC (1995) Expression of two mucin antigens in cultured human ovarian surface epithelium: influence of a family history of ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, **173**, 558-65.
- Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG, Kruk PA (1994) Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest*, **71**, 510-8.
- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*, **22**, 255-88.
- Bässler R, Remmele W (1997) Weibliches Genitale, Mamma, Pathologie der Schwangerschaft, der Plazenta und des Neugeborenen, Infektionskrankheiten des Fetus und des Neugeborenen, Tumoren des Kindesalters, Endokrine Organe : mit 155 Tabellen, Springer, Berlin [u.a.].
- Behrens J, Mareel MM, Van Roy FM, Birchmeier W (1989) Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, **108**, 2435-47.
- Birchmeier W, Hulsken J, Behrens J (1995) E-cadherin as an invasion suppressor. *Ciba Found Symp*, **189**, 124-36; discussion 136-41, 174-6.
- Bjersing L, Cajander S (1974) Ovulation and the mechanism of follicle rupture. V. Ultrastructure of tunica albuginea and theca externa of rabbit graafian follicles prior to induced ovulation. *Cell Tissue Res*, **153**, 15-30.
- Blaustein A, Lee H (1979) Surface cells of the ovary and pelvic peritoneum: a histochemical and ultrastructure comparison. *Gynecol Oncol*, **8**, 34-43.
- Breckwoldt M (1994) Exempla endokrinologica : Bildatlas zur Physiologie und Morphologie des endokrinen Systems Bd. 2 [...], Medical Service, München.
- Casagrande JT, Louie EW, Pike MC, Roy S, Ross RK, Henderson BE (1979) "Incessant ovulation" and ovarian cancer. *Lancet*, **2**, 170-3.
- Christofori G (2006) New signals from the invasive front. *Nature*, **441**, 444-50.
- Cramer DW, Hutchison GB, Welch WR, Scully RE, Knapp RC (1982) Factors affecting the association of oral contraceptives and ovarian cancer. *N Engl J Med*, **307**, 1047-51.
- Cramer DW, Welch WR (1983) Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst*, **71**, 717-21.
- Cruet S, Salamanca C, Mitchell GW, Auersperg N (1999) α v β 3 and vitronectin expression by normal ovarian surface epithelial cells: role in cell adhesion and cell proliferation. *Gynecol Oncol*, **75**, 254-60.
- Darai E, Bringuier AF, Walker-Combrouze F, Feldmann G, Madelenat P, Scoazec JY (1998) Soluble adhesion molecules in serum and cyst fluid from patients with cystic tumours of the ovary. *Hum Reprod*, **13**, 2831-5.

- Davies BR, Worsley SD, Ponder BA (1998) Expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in normal ovarian surface epithelium and epithelial ovarian cancers. *Histopathology*, **32**, 69-80.
- De Santis G, Miotti S, Mazzi M, Canevari S, Tomassetti A (2009) E-cadherin directly contributes to PI3K/AKT activation by engaging the PI3K-p85 regulatory subunit to adherens junctions of ovarian carcinoma cells. *Oncogene*, **28**, 1206-17.
- Derycke LD, Bracke ME (2004) N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*, **48**, 463-76.
- Efstathiou JA, Pignatelli M (1998) Modulation of epithelial cell adhesion in gastrointestinal homeostasis. *Am J Pathol*, **153**, 341-7.
- Fathalla MF (1971) Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*, **2**, 163.
- Fenyves AM, Behrens J, Spanel-Borowski K (1993) Cultured microvascular endothelial cells (MVEC) differ in cytoskeleton, expression of cadherins and fibronectin matrix. A study under the influence of interferon-gamma. *J Cell Sci*, **106** (Pt 3), 879-90.
- Friesel R, Komoriya A, Maciag T (1987) Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *J Cell Biol*, **104**, 689-96.
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, et al. (1991) E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, **113**, 173-85.
- Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hirohashi S (1998) Beta-catenin mutation in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res*, **58**, 3526-8.
- Fukushima H, Iwasaki M, Yosie O, Igarashi H (2001) Induction of reduced endothelial permeability to horseradish peroxidase by factor(s) of human astrocytes and bladder carcinoma cells: detection in multi-well plate culture. *Methods Cell Sci*, **23**, 211-9.
- Gillett WR, Mitchell A, Hurst PR (1991) A scanning electron microscopic study of the human ovarian surface epithelium: characterization of two cell types. *Hum Reprod*, **6**, 645-50.
- Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F (1999) Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol*, **19**, 389-429.
- Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, Akslen LA (2007) A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, **13**, 7003-11.
- Grinberg-Rashi H, Ofek E, Perelman M, et al. (2009) The expression of three genes in primary non-small cell lung cancer is associated with metastatic spread to the brain. *Clin Cancer Res*, **15**, 1755-61.
- Gumbiner B, Stevenson B, Grimaldi A (1988) The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol*, **107**, 1575-87.
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**, 345-57.
- Hay ED (1995) An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*, **154**, 8-20.
- Hayflick L (1998) A brief history of the mortality and immortality of cultured cells. *Keio J Med*, **47**, 174-82.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, **25**, 585-621.
- Herzog V, Fahimi HD (1973) A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3,3'-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Anal Biochem*, **55**, 554-62.
- Hirte HW, Clark DA, Mazurka J, O'Connell G, Rusthoven J (1992) A rapid and simple method for the purification of tumor cells from ascitic fluid of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, **44**, 223-6.

- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*, **75**, 734-8.
- Hudson LG, Zeineldin R, Stack MS (2008) Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. *Clin Exp Metastasis*, **25**, 643-55.
- Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, **171**, 939-45.
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS (2008) Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, **27**, 6920-9.
- Kemler R (1993) From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet*, **9**, 317-21.
- Krug SM, Amasheh S, Richter JF, et al. (2009) Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell*, **20**, 3713-24.
- Kruk PA, Auersperg N (1992) Human ovarian surface epithelial cells are capable of physically restructuring extracellular matrix. *Am J Obstet Gynecol*, **167**, 1437-43.
- Kruk PA, Maines-Bandiera SL, Auersperg N (1990) A simplified method to culture human ovarian surface epithelium. *Lab Invest*, **63**, 132-6.
- Kruk PA, Uitto VJ, Firth JD, Dedhar S, Auersperg N (1994) Reciprocal interactions between human ovarian surface epithelial cells and adjacent extracellular matrix. *Exp Cell Res*, **215**, 97-108.
- Kurman RJ, Shih Ie M (2010) The origin and pathogenesis of the epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*, **34**, 433-43.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA (1999) Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin*, **49**, 8-31, 1.
- Li NF, Wilbanks G, Balkwill F, Jacobs IJ, Dafou D, Gayther SA (2004) A modified medium that significantly improves the growth of human normal ovarian surface epithelial (OSE) cells in vitro. *Lab Invest*, **84**, 923-31.
- Lindl T, Gstraunthaler G (2008) *Zell- und Gewebekultur : von den Grundlagen zur Laborbank*, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg.
- MacCalman CD, Farookhi R, Blaschuk OW (1994) Estradiol regulates E-cadherin mRNA levels in the surface epithelium of the mouse ovary. *Clin Exp Metastasis*, **12**, 276-82.
- MacEntee K (1990) *Reproductive pathology of domestic mammals*, Academic Press, San Diego.
- Maines-Bandiera SL, Auersperg N (1997) Increased E-cadherin expression in ovarian surface epithelium: an early step in metaplasia and dysplasia? *Int J Gynecol Pathol*, **16**, 250-5.
- Maines-Bandiera SL, Kruk PA, Auersperg N (1992) Simian virus 40-transformed human ovarian surface epithelial cells escape normal growth controls but retain morphogenetic responses to extracellular matrix. *Am J Obstet Gynecol*, **167**, 729-35.
- Mannel DN, Falk W (1983) Interferon-gamma is required in activation of macrophages for tumor cytotoxicity. *Cell Immunol*, **79**, 396-402.
- Marques FR, Fonsechi-Carvasan GA, De Angelo Andrade LA, Bottcher-Luiz F (2004) Immunohistochemical patterns for alpha- and beta-catenin, E- and N-cadherin expression in ovarian epithelial tumors. *Gynecol Oncol*, **94**, 16-24.
- Marth C, Muller-Holzner E, Greiter E, et al. (1990) Gamma-interferon reduces expression of the protooncogene c-erbB-2 in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, **50**, 7037-41.

- Marth C, Windbichler GH, Hausmaninger H, et al. (2006) Interferon-gamma in combination with carboplatin and paclitaxel as a safe and effective first-line treatment option for advanced ovarian cancer: results of a phase I/II study. *Int J Gynecol Cancer*, **16**, 1522-8.
- Marth C, Zeimet AG, Herold M, et al. (1996) Different effects of interferons, interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in normal (OSE) and malignant human ovarian epithelial cells. *Int J Cancer*, **67**, 826-30.
- Menco BP (1988) Tight-junctional strands first appear in regions where three cells meet in differentiating olfactory epithelium: a freeze-fracture study. *J Cell Sci*, **89 (Pt 4)**, 495-505.
- Miller CH, Maher SG, Young HA (2009) Clinical Use of Interferon-gamma. *Ann N Y Acad Sci*, **1182**, 69-79.
- Montesano R, Mossaz A, Ryser JE, Orci L, Vassalli P (1984) Leukocyte interleukins induce cultured endothelial cells to produce a highly organized, glycosaminoglycan-rich pericellular matrix. *J Cell Biol*, **99**, 1706-15.
- Murdoch WJ, Martinchick JF (2004) Oxidative damage to DNA of ovarian surface epithelial cells affected by ovulation: carcinogenic implication and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229**, 546-52.
- Musil LS, Cunningham BA, Edelman GM, Goodenough DA (1990) Differential phosphorylation of the gap junction protein connexin43 in junctional communication-competent and -deficient cell lines. *J Cell Biol*, **111**, 2077-88.
- Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, Yasuda K, Takeichi M (1987) Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, **329**, 341-3.
- Nagar B, Overduin M, Ikura M, Rini JM (1996) Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*, **380**, 360-4.
- Nelson WJ (2003) Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature*, **422**, 766-74.
- Nicosia SV, Johnson JH (1984) Surface morphology of ovarian mesothelium (surface epithelium) and of other pelvic and extrapelvic mesothelial sites in the rabbit. *Int J Gynecol Pathol*, **3**, 249-60.
- Osterholzer HO, Streibel EJ, Nicosia SV (1985) Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod*, **33**, 247-58.
- Parrott JA, Mosher R, Kim G, Skinner MK (2000) Autocrine interactions of keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and kit-ligand in the regulation of normal ovarian surface epithelial cells. *Endocrinology*, **141**, 2532-9.
- Pecorelli S, Odicino F, Favalli G (2002) Interval debulking surgery in advanced epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **16**, 573-83.
- Perez RP, Godwin AK, Hamilton TC, Ozols RF (1991) Ovarian cancer biology. *Semin Oncol*, **18**, 186-204.
- Peyrieras N, Hyafil F, Louvard D, Ploegh HL, Jacob F (1983) Uvomorulin: a nonintegral membrane protein of early mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 6274-7.
- Piquette GN, Timms BG (1990) Isolation and characterization of rabbit ovarian surface epithelium, granulosa cells, and peritoneal mesothelium in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol*, **26**, 471-81.
- Prudkin L, Liu DD, Ozburn NC, et al. (2009) Epithelial-to-mesenchymal transition in the development and progression of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Mod Pathol*, **22**, 668-78.
- Pujade-Lauraine E, Guastalla JP, Colombo N, et al. (1996) Intraperitoneal recombinant interferon gamma in ovarian cancer patients with residual disease at second-look laparotomy. *J Clin Oncol*, **14**, 343-50.

- Ribeiro AF, Ferronha MH, David-Ferreira JF (1983) Freeze-fracture study of the hamster ovary surface epithelium intercellular junctions. *J Submicrosc Cytol*, **15**, 415-23.
- Ricken A, Rahner C, Landmann L, Spanel-Borowski S (1996) Bovine endothelial-like cells increase intercellular junctions under treatment with interferon-gamma. An in vitro study. *Ann Anat*, **178**, 321-30.
- Risinger JJ, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J (1994) Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet*, **7**, 98-102.
- Rowlands TM, Symonds JM, Farookhi R, Blaschuk OW (2000) Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. *Rev Reprod*, **5**, 53-61.
- Ryan PL, Valentine AF, Bagnell CA (1996) Expression of epithelial cadherin in the developing and adult pig ovary. *Biol Reprod*, **55**, 1091-7.
- Salamanca CM, Maines-Bandiera SL, Leung PC, Hu YL, Auersperg N (2004) Effects of epidermal growth factor/hydrocortisone on the growth and differentiation of human ovarian surface epithelium. *J Soc Gynecol Investig*, **11**, 241-51.
- Sato N, Goto T, Haranaka K, et al. (1986) Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst*, **76**, 1113-21.
- Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A, Jahnke K, Birchmeier W (1991) E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res*, **51**, 6328-37.
- Schneeberger EE, Lynch RD (2004) The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, **286**, C1213-28.
- Serov SF, Scully RE (1997) Histological classification of ovarian tumors, histological typing of ovarian tumors. International classification of tumors. Geneva: *World Health Organisation*
- Sherr CJ, DePinho RA (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, **102**, 407-10.
- Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, et al. (1989) Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res*, **49**, 2128-33.
- Siemens CH, Auersperg N (1988) Serial propagation of human ovarian surface epithelium in tissue culture. *J Cell Physiol*, **134**, 347-56.
- Sivertsen S, Berner A, Michael CW, Bedrossian C, Davidson B (2006) Cadherin expression in ovarian carcinoma and malignant mesothelioma cell effusions. *Acta Cytol*, **50**, 603-7.
- Sommers CL, Thompson EW, Torri JA, Kemler R, Gelmann EP, Byers SW (1991) Cell adhesion molecule uvomorulin expression in human breast cancer cell lines: relationship to morphology and invasive capacities. *Cell Growth Differ*, **2**, 365-72.
- Stamatoglou SC, Hughes RC (1994) Cell adhesion molecules in liver function and pattern formation. *FASEB J*, **8**, 420-7.
- Stolpen AH, Guinan EC, Fiers W, Pober JS (1986) Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. *Am J Pathol*, **123**, 16-24.
- Sundfeldt K, Piontkewitz Y, Ivarsson K, et al. (1997) E-cadherin expression in human epithelial ovarian cancer and normal ovary. *Int J Cancer*, **74**, 275-80.
- Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, **251**, 1451-5.
- Thiery JP, Delougee A, Grumet M, Edelman GM (1985) Initial appearance and regional distribution of the neuron-glia cell adhesion molecule in the chick embryo. *J Cell Biol*, **100**, 442-56.
- Tomita K, van Bokhoven A, van Leenders GJ, et al. (2000) Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res*, **60**, 3650-4.

- Tsao SW, Mok SC, Fey EG, et al. (1995) Characterization of human ovarian surface epithelial cells immortalized by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFs). *Exp Cell Res*, **218**, 499-507.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 285-93.
- Tunggal JA, Helfrich I, Schmitz A, et al. (2005) E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *EMBO J*, **24**, 1146-56.
- Van Niekerk CC, Ramaekers FC, Hanselaar AG, Aldeweireldt J, Poels LG (1993) Changes in expression of differentiation markers between normal ovarian cells and derived tumors. *Am J Pathol*, **142**, 157-77.
- van Roy F, Berx G (2008) The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3756-88.
- Vleminckx K, Vakaet L, Jr., Mareel M, Fiers W, van Roy F (1991) Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, **66**, 107-19.
- Wall L, Burke F, Smyth JF, Balkwill F (2003) The anti-proliferative activity of interferon-gamma on ovarian cancer: in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol*, **88**, S149-51.
- Wan TS, Chan LC, Ngan HY, Tsao SW (1997) t(High) frequency of telomeric associations in human ovarian surface epithelial cells transformed by human papilloma viral oncogenes. *Cancer Genet Cytogenet*, **95**, 166-72.
- Watabe M, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M (1994) Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J Cell Biol*, **127**, 247-56.
- Williams AF, Barclay AN (1988) The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol*, **6**, 381-405.
- Windbichler GH, Hausmaninger H, Stummvoll W, et al. (2000) Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br J Cancer*, **82**, 1138-44.
- Wong AS, Leung PC (2007) Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium. *J Obstet Gynaecol Res*, **33**, 3-16.
- Wong AS, Maines-Bandiera SL, Rosen B, et al. (1999) Constitutive and conditional cadherin expression in cultured human ovarian surface epithelium: influence of family history of ovarian cancer. *Int J Cancer*, **81**, 180-8.
- Wu C, Cipollone J, Maines-Bandiera S, et al. (2008) The morphogenic function of E-cadherin-mediated adherens junctions in epithelial ovarian carcinoma formation and progression. *Differentiation*, **76**, 193-205.
- Yang J, Weinberg RA (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, **14**, 818-29.
- Yap AS (1998) The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: a thematic review. *Cancer Invest*, **16**, 252-61.
- Yener Z, Karaca F, Alan M (2004) Serous papillary cystadenoma in the ovary of a cow. *Aust Vet J*, **82**, 781-3.
- Yoshida C, Takeichi M (1982) Teratocarcinoma cell adhesion: identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell*, **28**, 217-24.
- Yoshida J, Horiuchi A, Kikuchi N, et al. (2009) Changes in the expression of E-cadherin repressors, Snail, Slug, SIP1, and Twist, in the development and progression of ovarian carcinoma: the important role of Snail in ovarian tumorigenesis and progression. *Med Mol Morphol*, **42**, 82-91.
- Young JA, Garretson F, Westlake DL, Illig WP, Vogl SE (1989) Intraperitoneal cisplatin with intravenous cyclophosphamide and doxorubicin for previously untreated stage III and IV ovarian carcinoma. *Cancer Invest*, **7**, 565-70.

Danksagung

Mein größter und herzlichster Dank richtet sich an erster Stelle an Frau Professor Dr. med. Spanel-Borowski für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes. Weiterhin möchte ich mich für ihre fachliche Unterstützung und insbesondere für die Anregungen, Ratschläge und Kommentare, die für die Verfassung dieses interessanten Promotionsthemas unerlässlich waren, bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Ingo Bechmann danke ich sehr für seine Unterstützung in der letzten Phase meiner Dissertation.

Mein Dank gilt Herrn Dr. med. Albert Ricken für die Betreuung und hilfreichen Ratschlägen bei der Durchführung der Laborarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Höckel, OA Dr. med. Jens Einenkel sowie OA Dr. med. Gero Teichmann danke ich für die Bereitstellung der humanen Abstriche aus der Frauenklinik Leipzig. Herrn Prof. Dr. med. Lars Christian Horn danke ich für die Bereitstellung der humanen Paraffinschnitte aus der Pathologie Leipzig. Dem Schlachthof Altenburg danke ich für die Bereitstellung des bovinen Materials.

Frau Angela Ehrlich sowie Frau Claudia Merkwitz danke ich für deren praktische Unterstützung im Labor sowie für die Abholung des bovinen Materials aus Altenburg.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Kollegen der Anatomieinstituts, die mich während meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben: Herrn PD Dr. med. Faramarz Dehghani, Herrn Dr. med. Nikoloz Tsikolia, Herrn Dr. phil. nat. Marco Koch, Herrn Thomas Schröder, Frau Dipl. Biochem. Katja Sygnecka und Frau Judith Bausenwein.

Bei meinem Freund Hans-Georg möchte ich mich bedanken, dass er neben der fachlichen Unterstützung vor allem an meiner Seite war, mich immer aufmunterte und mir den Antrieb gab niemals aufzugeben trotz einiger Schwierigkeiten.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben, an mich immer geglaubt haben und zur Seite standen.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Eleni Valerkou
Geburtsdatum: 23. Oktober 1982
Geburtsort: Athen, Griechenland
Familienstand: ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit: Zypern
Adresse: Karlstraße 18, 04316 Leipzig
Telefon, Email: 0176-45196686, evalerkou@hotmail.com

Schul Ausbildung:

1989 – 1994 Grundschole Sotiros, Larnaca Zypern
1994 – 1997 Drosia Gymnasium Larnaca, Zypern
1997 – 2000 St. Georg Gymnasium, Zypern
Abschluss: Abitur

Berufsausbildung und Studium:

2000 – 2001 Deutscher Sprachkurs: Grundstufe und Mittelstufe interDaF e.V,
Herder Institut, Universität Leipzig
2001 – 2008 Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
08 / 2004 Physikum mit Note „ befriedigend “
12 / 2008 Staatsexamen mit Note „ gut “
seit 01 / 2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotionsstudentin,
Medizinischer Fakultät, Institut für Anatomie, Universität
Leipzig
29 – 31 /10 / 2009 Teilnahme am 5. Weltkongress für Regenerative Medizin in
Leipzig mit Poster;
Thema: “Interferon-gamma increases the expression of
epithelial cell markers in surface epithelial cells of the ovary”

Famulaturen:

2005	Famulatur in der Chirurgie-Klinik Larnaca, Zypern
2006	Famulatur in der pädiatrischen Praxis, Frau Dr. M. Zamba, Zypern
2007	Famulatur in der dermatologischen Praxis, Frau Dr. S. Fischer, Leipzig

Praktisches Jahr:

08 / 2007 - 12 / 2007	Chirurgie: Städtisches Krankenhaus Larnaca, Zypern
12 / 2007 - 04 / 2008	Dermatologie: Universitätshautklinik Leipzig
04 / 2008 - 06 / 2008	Innere: Kardiologische Intensivstation, Herzzentrum, Leipzig
06 / 2008 - 07 / 2008	Innere: Notfallaufnahme Universitätsklinikum, Leipzig

Besondere Kenntnisse:

Fremdsprachen	Griechisch - Muttersprache Englisch - fließend in Wort und Schrift
Laborfähigkeiten	Konfokale Mikroskopie, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, Technik der Zellkultur und Proteinanalyse mit Western Blot Verfahren
Softwarekenntnisse	Windows 2000/XP MS Office, Adobe Photoshop

Leipzig, 12.05.2010

Eleni Valerkou

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass ich Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die für das Entstehen der vorliegenden Dissertation relevant waren und dass die vorgelegte Promotionsschrift weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungskommission zum Zweck der Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen oder von anderen Personen übernommene Material, welches in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wurde, ist als solches gekennzeichnet. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an dem Entstehen der Promotionsschrift Anteil beteiligt waren.

Leipzig, den 12.05.2010

Eleni Valerkou